EIN BEITRAG ZUR ANALYSE DER GIBBERELLINE IN SAMEN VON PISUM SATIVUM L.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität
zu Würzburg

vorgelegt von
Wolfram Konopka
aus Königsberg/Pr.

Würzburg 1966

1967

EIN BEITRAG ZUR ANALYSE DER GIBBERELLINE IN SAMEN VON PISUM SATIVUM L.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität
zu Würzburg

vorgelegt von
Wolfram Konopka
aus Königsberg/Pr.

Würzburg 1966

Referent: Dr. E. Reinhard

Korreferenten: Professor Dr. O. H. Volk
Professor Dr. W. Simonis

Tag der Einreichung: 18.11.1966

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dez 1966

Tag der Promotion: 5. 1. 67

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1963 bis 1966 am Pharmakognostischen Institut der Universität Würzburg unter der Leitung von Herrn Dr. E. Reinhard ausgeführt.

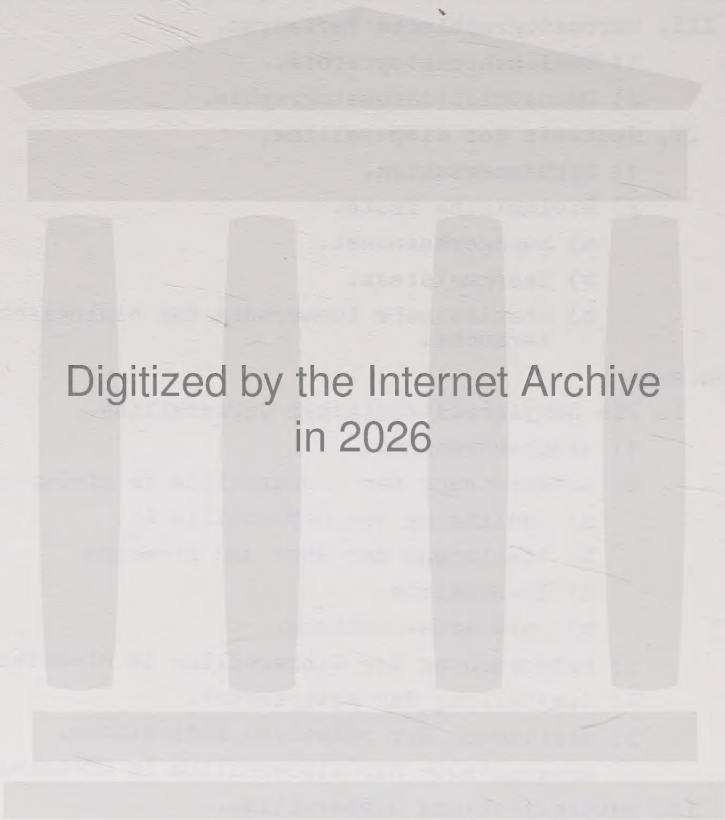
Mein besonderer Dank gilt dem Leiter des Instituts, Herrn Professor Dr. O. H. Volk, für die Förderung der Arbeit und für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Dr. E. Reinhard, sei an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und seine Anregungen gedankt.

Inhaltsverzeichnis

Seite:

Einleitung. 1
Problemstellung. 7
Material und Methoden. 9
I. Untersuchungsmaterial. 9
II. Extraktion und Vortrennung der Gibberelline. 9
III. Chromatographische Verfahren. 13
1) Säulenchromatographie. 13
2) Dünnschichtchromatographie. 14
IV. Nachweis der Gibberelline. 17
1) Sprühreagenzien. 17
2) Biologische Teste. 18
a) Zwergerbsentest. 19
b) Zwergmaistest. 22
c) Statistische Auswertung der biologischen Versuche. 23
Ergebnisse. 26
I. Die äthylacetatlöslichen Gibberelline. 26
1) Gruppentrennung. 26
2) Untersuchung der Gibberelline im Rf-Bereich A_3. 28
a) Isolierung von Gibberellin A_X. 33
b) Bestimmung der Rst- und Rf-Werte. 36
c) IR-Spektrum. 37
d) Emissions-Spektrum. 39
3) Untersuchung der Gibberelline im Rf-Bereich A_5. 43
4) Darstellung der Methylester. 49
5) Bestimmung der relativen Aktivitäten. 50
6) Untersuchung der Gibberelline im Rf-Bereich A_8. 56
II. Butanollösliche Gibberelline. 59
Diskussion. 61
Zusammenfassung. 64
Literaturverzeichnis. 65
Bezugsquellen-Nachweis. 72



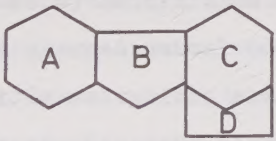
Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544724_0026

Einleitung

Gibberelline wurden zuerst als Stoffwechselprodukte des auf Reis parasitierenden Pilzes Gibberella fujikuroi SAW. (cf. Fusarium moniliforme SHELD.) gefunden. Sie wurden durch zahlreiche Untersuchungen als natürliche Wachstumsregulatoren für höhere Pflanzen (3, 46) erkannt.

Chemisch versteht man unter dem Begriff "Gibberelline" eine Gruppe von tetracarbocyclischen Carbonsäuren, die den Diterpenen zuzuordnen sind. Nach Vorschlägen von GROVE (15) wird dieses tetracarbocyclische Ringsystem als Gibban bezeichnet. Es ist allen Gibberellinen eigen.



Gibban

Das erste - chemisch reine - Gibberellin gewannen CURTIS und CROSS (11) aus den Kulturfiltraten des Pilzes Gibberella fujikuroi, das sie Gibberellinsäure nannten und das später als Gibberellin A_3 bezeichnet wurde (46). Diese Substanz ist identisch mit dem Gibberellin X, das STODOLA et al. (60) aus dem gleichen Substrat isolierten.

Bis zum Jahre 1957 wurden drei weitere Pilz-Gibberelline entdeckt, die als A_1, A_2 und A_4 bezeichnet wurden (CROSS et al. 8). 1962 berichteten die gleichen Autoren (8, 9) über die Isolierung der Gibberelline A_7 und A_9, die sich bei Änderung des Kulturmediums von Gibberella fujikuroi neben den bekannten Gibberellinen gebildet hatten. Auf der Suche nach einem Biosytheseweg der Gibberelline wurden aus den Kulturfiltraten dieses Pilzes weiter die Gibberelline A_{10} bis A_{14} entdeckt (5, 10, 14, 43). Die Gibberelline A_{12} bis A_{14} unterscheiden sich von den anderen durch ein Mehr von 1 bis 2 Carboxylgruppen am Gibban-Skelett.

Gibberelline sind nicht nur Stoffwechselprodukte des Pilzes Gibberella fujikuroi, sondern wurden neuerdings auch in zahlreichen höheren Pflanzen gefunden. So wurde Gibberellin A_1 von MACMILLAN und SUTER (36) aus unreifen Samen von Phaseolus multiflorus (= coccineus) isoliert. WEST und PHINNEY (65) fanden dann in den unreifen Samen von Phaseolus vulgaris biologisch aktive Substanzen, den "Bohnenfaktor" I und II, die sich in späteren Untersuchungen als Gibberellin A_1 resp. A_5 (33) erwiesen. Ebenfalls aus Bohnensamen wurden die Gibberelline A_6 und A_8 isoliert (35).

Gibberellin A_3, das lange Zeit nur als Stoffwechselprodukt von Gibberella fujikuroi bekannt war, wurde neuerdings in verschiedenen Blütenpflanzen aufgefunden (12, 20, 21, 56, 57). Erstmals isolierten JONES et al.(21) dieses

Gibberellin aus unreifen Früchten von Gerste und verschiedenen Wildgrasarten, wie Lolium perenne, Dactylis glomerata, Phelum pratense, Festuca pratensis und Poa pratensis. JONES (20) entdeckte es ebenfalls in einem Extrakt von Zea mays sowie in allen Teilen der Samen von Phaseolus multiflorus. SEMBDNER et al. (56) hingegen konnten Gibberellin A_3 lediglich in den Hülsen von Phaseolus coccineus (= multiflorus) nachweisen, jedoch nicht in den Samen. Auch die Gibberelline A_4, A_7 und A_9, die zunächst nur von Gibberella fujikuroi bekannt waren, wurden in Blütenpflanzen gefunden. ELSON et al.(12 wiesen die Gibberelline A_4 und A_7 neben A_1 und A_3 in den Samen der Cucurbitacee Echinocystis macrocarpa nach, und KHALIFAH et al. (27) bestimmten A_1 und A_9 neben einer noch unbekannten biologisch aktiven Substanz aus den unreifen Früchten von Citrus-Arten. KHALIFAH (26) war es auch, der in jungen Bananenfrüchten das Gibberellin A_7 dünnschichtchromatographisch nachweisen konnte. Nach neuesten Forschungsergebnissen von KOSHIMIZU et al. (28) ist aus unreifen Samen von Lupinus luteus ein für diese Pflanze spezifisches "Lupinus Gibberellin-I" isoliert wo den.

Die Isolation von Gibberellinen gelang jedoch nicht nur aus unreifen Samen, sondern auch aus anderen Pflanzentei len. So konnten KAWARADA und SUMIKI (24) in den Wasserschossen von Citrus unshuii Gibberellin A_1 nachweisen. SEMBDNER und SCHREIBER (57) gelang die Identifizierung der Gibberelline A_1 und A_3 in Sproßspitzen und Blüten-

knospen von Nicotiana tabaccum. TAMURA et al. (61) berichteten über die Isolierung und Strukturaufklärung eines neuen "Bambus-Gibberellins", das sie aus Bambusschossen gewannen.

Der Isolierung von Reingibberellinen aus höheren Pflanzen gingen Arbeiten über das Vorkommen "gibberellinartiger Substanzen" voraus. Es handelt sich dabei um biologisch aktive Stoffe, die physiologisch ähnliche Wirkungen aufweisen wie die Gibberelline, infolge ihres mengenmäßig geringen Vorkommens jedoch diesen chemisch nicht eindeutig zugeordnet werden können. PHINNEY und WEST (45) und PHINNEY et al. (48) fanden derartige Stoffe in unreifen Samen aus sieben Pflanzenfamilien. RADLEY (50) entdeckte sie in Erbsenkeimlingen von Zwerg- und Normalformen, sowie in reifen Früchten von Triticum vulgare und Samen von Phaseolus vulgaris und Pisum sativum. MURAKAMI (58, 59) fand sie in reifen und unreifen Samen vieler Leguminosen.

Außer den bereits erwähnten Gibberellinen wurden noch stärker polare, biologisch aktive Substanzen, sogenannte "gebundene Gibberelline", in Blütenpflanzen nachgewiesen (MURAKAMI 40; MCCOMB 32). SEMBDNER et al.(56, 57) fanden in Extrakten von Phaseolus coccineus und Nicotiana tabaccum solche "gebundene Gibberelline", die an Zucker bzw. ninhydrinpositive Substanzen gebunden sein sollen. WIERZCHOWSKI und WIERZCHOWSKA (66) erhielten bei ihren Untersuchungen über Fluoren-Derivate in den Fermentationsprodukten von Gibberella fujikuroi zwei neue Verbindungen,

die im neutralen Bereich (pH 7 - 8) aus der wäßrigen Phase mit Benzol ausschüttelbar sind. Die UV- und IR-Spektren der beiden Verbindungen sowie chemische Untersuchungen deuten auf einen engen Zusammenhang mit den schon bekannten Gibberellinen hin. Die Substanzen besitzen jedoch keine freie Carboxyl-Gruppe, was auch den Übergang in die organische Phase im neutralen Bereich erklärt. Von einer dieser Verbindungen wurde die biologische Aktivität auf Salat-Keimlingen untersucht und eine der Gibberellinsäure entgegengesetzte Wirkung festgestellt (Verkürzung der Hypokotyle).

Alle oben genannten Verbindungen mit Gibban-Struktur erwiesen sich als physiologisch wirksame Substanzen. Einige ihrer spezifischen Wirkungen seien hier genannt: Sproßverlängerung zum normalen Wuchs bei Zwergrassen von Pisum sativum, Phaseolus vulgaris und einigen Zwergmaismutanten (BRIAN und HEMMING 4; PHINNEY 44), Auslösung des Schossens und der Blütenbildung bei Langtags- und kältebedürftigen Pflanzen (LANG 29; LANG und REINHARD 30) und Auslösung der Keimung bei dem Lichtkeimer Lactuca sativa (KAHN et al. 22). Gibberelline lösen weiterhin Zellteilungs- und Zellstreckungsvorgänge aus (SACHS, BRETZ und LANG 54), sowie Bildungen von parthenokarpen Früchten bei Blütenpflanzen (WITTWER et al. 67). PALEG (42, 43) konnte mit Gibberellin A_3 die Amylasen im Gersten-Endosperm aktivieren und auf diese Weise den Abbau der Stärke zu Maltose und Glukose fördern. Aufgrund dieser physiologischen Wirkungen werden die Gibberelline als "biologisch aktive"

Substanzen bezeichnet und zur Klasse der Wuchsstoffe gerechnet.

Die für die Gibberelline typischen biologischen Wirkungen sind jedoch nicht ausschließlich an die Gibban-Struktur gebunden. TAMURA et al. (62) isolierten aus den Kulturfiltraten des Pilzes Helminthosporium sativum ein Sesquiterpen mit biologischer Aktivität. HAYASHI et al. (17, 18, 19) konnten zwei chemisch neutrale, gibberellinwirksame Substanzen aus den Schalen schossender Kartoffeln nachweisen, die sie "Kartoffelfaktor" I und II nannten. Sie lassen sich im neutralen pH-Bereich (pH 7,5) aus der wäßrigen Phase mit Äthylacetat ausschütteln. Kartoffelfaktor II fiel in größeren Mengen an und konnte kristallin erhalten werden. Aufgrund des IR- bzw. NMR-Spektrums wurde keine Ähnlichkeit mit den Gibberellinen festgestellt. Ähnliche gibberellinartige Substanzen, die sich im neutralen pH-Bereich mit Äthylacetat ausschütteln lassen, konnten HASHIMOTO und RAPPAPORT (16) aus reifen Bohnensamen isolieren.

Problemstellung.

Vergleichende Untersuchungen an unserem Institut über die biologische Wirksamkeit von Extrakten von Pisum sativum und Phaseolus coccineus ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Während der Bohnenextrakt stark wachstumsfördernde Wirkung sowohl im Test auf Zwergerbsen als auch auf Zwergmaismutanten zeigte, erwies sich der Erbsenextrakt nur auf Zwergmaispflanzen stark aktiv. Aufgrund dieser Vorversuche ließ sich vermuten, daß im Pisum sativum ein anderes Spektrum der Gibberelline vorliegt als in Phaseolus coccineus.

Während die Gibberelline von Phaseolus multiflorus (= coccineus) (34,56) bereits seit einigen Jahren gut untersucht sind, liegen diesbezüglich bei Pisum sativum aus der gleichen Pflanzenfamilie keine eindeutigen Angaben vor (46). Verschiedene Autoren (38, 39, 48, 50) haben sich mit den gibberellinartigen Substanzen in Pisum sativum befaßt. So berichtet RADLEY (50) über die Anwesenheit "gibberellinsäureähnlicher" Substanzen in reifen Samen von Zwergrassen und normalen Pflanzen sowie in allen Teilen von Keimlingen von Pisum sativum. MURAKAMI (38, 39) fand in reifen und unreifen Samen verschiedener Leguminosearten im chromatographischen Verhalten unterschiedlich wirksame Substanzen. PHINNEY et al. (48) stellten fest, daß die Rf-Werte der biologisch aktiven Stoffe von Pisum sativum mit denen der Vergleichsgibberelline A_1, A_2 und A_3 nicht übereinstimmten. WEST und MURASHIGE (63) isolierten einen "Erbsenfak-

tor", der in den biologischen Eigenschaften dem "Bohnenfaktor" II ähnlich war, den MACMILLAN et al. (33) als Gibberellin A_5 identifizieren konnten.

Vorliegende Arbeit möchte daher einen Beitrag zur Analyse der Gibberelline von Pisum sativum liefern.

Material und Methoden

I. Untersuchungsmaterial:

Als Untersuchungsmaterial dienten 40 kg tiefgefrorene, unreife Samen von Pisum sativum L. der Sorte"Siegerin", die vom Lebensmittelgroßhandel in Würzburg bezogen wurden.

II. Extraktion und Vortrennung der Gibberelline.

Die Extraktion der Erbsen erfolgte mit Methanol. Sie wurde aus praktischen Gründen in Portionen von je 2 kg vorgenommen. Zur Analyse der Gibberelline von Pisum sativum wählte ich, in Anlehnung an die Arbeit von MACMILLAN, SEATON und SUTER (33) folgende Extraktionsmethode:

Die unzerkleinerten Samen wurden zunächst einer Vorextraktion unterworfen. Dazu wurde jeder Ansatz mit 4 l reinem Methanol 6 Stunden lang auf einer Schüttelmaschine geschüttelt und anschließend abgenutscht. Die Erbsen wurden darauf in einem Mörser zerdrückt und dieses Verfahren wiederholt. Darauf wurden die Samen im Luftstrom vom Methanol befreit und schließlich gefriergetrocknet. Diese Vorbehandlung ist notwendig, um durch Wasserentzug einem möglichen enzymatischen Abbau der biologisch aktiven Substanzen bzw. Veränderungen derselben während der Extraktion vorzubeugen.

Zur erschöpfenden Extraktion wurden die in einer Pulvermühle zerkleinerten Erbsen zweimal mit je 1200 ml 70 %-igem Methanol 6 Stunden auf der Schüttelmaschine extrahiert. Die gesammelten Filtrate aller Extraktionen wurden am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck und einer Temperatur von 36° C vom Methanol befreit und auf ca. 250 ml eingeengt. Dieser wäßrige Extraktionsrückstand zeigte den pH-Wert von 5,8 bis 6,0. Er wurde einer ersten Reinigung und Vortrennung unterworfen, die in drei Stufen erfolgte:

1.) Durch Ausschütteln im a l k a l i s c h e n Medium mit Äthylacetat. Dieses diente der völligen Entfernung des Chlorophylls und basischer Pflanzenstoffe. Zur Ausführung wurde der Extrakt mit Trispuffer (Trishydroxymethylaminomethan, Merck) auf den pH-Wert von 8,0 bis 9,0 eingestellt und wiederholt mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Die Äthylacetatphasen wurden verworfen.

2.) Durch Ausschütteln im s a u r e n Medium mit Äthylacetat. Die nach der Ausschüttelung im alkalischen Medium verbliebene gelbbraune Lösung wurde mit 2n-HCl auf den pH-Wert von 2,0 bis 3,0 gebracht und mit je 300 ml Äthylacetat fünfmal ausgeschüttelt. Dabei wurden die freien Gibberellinsäuren neben anderen organischen Säuren in die Äthylacetatphase übernommen. Die vereinigten Äthylacetatphasen wurden unter wiederholtem Umschütteln über Natriumsulfat sicc. getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne

eingeengt. Dieser Rückstand wurde in Aceton aufgenommen und bis zur weiteren Reinigung in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt.

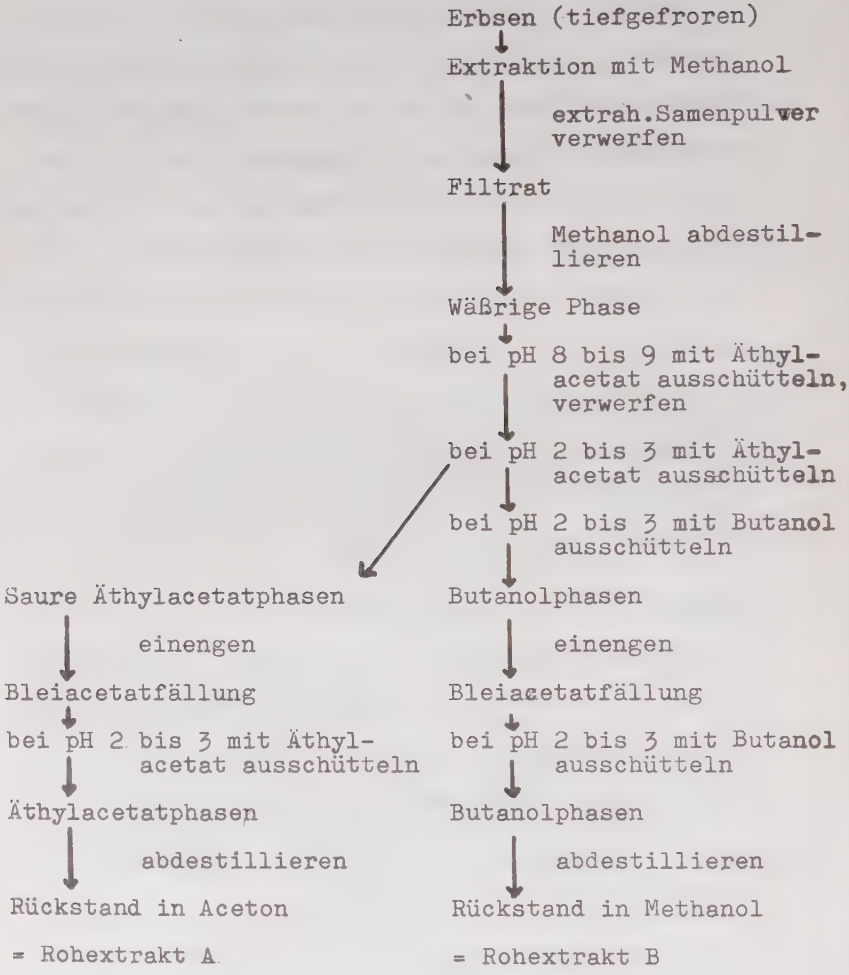
Der in Aceton gelöste Rückstand wurde zur Trockne eingeengt, in 150 ml Wasser aufgenommen und zur Entfernung eventuell störender, mitextrahierter Stoffe mit basischer Bleiacetat-Lösung DAB 6 gefällt (51). Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, die verbleibende wäßrige Lösung mit 2n HCl angesäuert und mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Dann wurde die Äthylacetatphase über Natriumsulfat sicc. getrocknet und schließlich am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der in Aceton gelöste Rückstand wurde in einer Tiefkühltruhe aufgehoben. Er wird in der Folge als Rohextrakt A bezeichnet.

3.) Durch Ausschütteln mit Butanol.

Die saure, wäßrige Phase des Erbsenextraktes wurde viermal mit je 300 ml n-Butanol ausgeschüttelt, um auf diese Weise die "gebundenen" Gibberelline (40, 56, 57) zu erfassen. Nach Entfernen des Butanols wurde der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und ein Teil davon weiterverarbeitet.

Die starke Verunreinigung dieses Extraktes machte eine zweimalige Fällung mit Bleiacetat notwendig. Der Überstand nach jeder Fällung wurde mit n-Butanol ausgeschüttelt. Nach Abdunsten des Butanols wurde der Rückstand wieder in Methanol aufgenommen. Er wird in der Folge als Rohextrakt B bezeichnet.

Schema des Extraktionsganges



III. Chromatographische Verfahren

Zur Reinigung und Auftrennung der Gibberelline wurden folgende Verfahren geprüft:

1. Säulenchromatographie
2. Dünnschichtchromatographie

1. Säulenchromatographie:

Entgegen den Erfahrungen von MACMILLAN et al. (34) konnte an der Kohle-Celite-Säule keine gute Trennung erzielt werden. Mit besserem Erfolg hingegen wurde die Celite-Silicagel-Säule bei der Reinigung und Anreicherung der Gibberelline angewandt.

Zur Herstellung der Säule wurden Celite 545 J. M. (Johns-Mandelville), und Silicagel M. F. C. im Mischungsverhältnis 15 : 7,5 g in Chloroform angeschlämmt und in ein Glasrohr der Größe 1,7 x 30 cm eingefüllt. Der Extrakt wurde an Silicagel adsorbiert und trocken auf die Säule aufgetragen. Eluiert wurde in 5 % Stufen mit Äthylacetat in Chloroform. Die Elution erfolgte in 100 ml Fraktionen. Die letzte Fraktion enthielt 200 ml reines Äthylacetat. Um auch die letzten Spuren der Gibberelline aus der Säule zu entfernen, wurde mit 200 ml Methanol nachgewaschen.

Dünnschichtchromatographie

Herstellung von DC-Platten

Das Beschichten der DC-Platten erfolgte in Anlehnung an STAHL (59):
Danach wurden 40 g des jeweiligen Sorptionsmittels in einem Mörser eingewogen und mit 80 ml einer 50 %-igen Isopropanol-Lösung zu einem flüssigen Brei angerührt. Dieser wurde in das DESAGA-Beschichtungsgerät (Fa. Desaga, Heidelberg) eingefüllt und über mit Seifenlösung gut entfetteten Glasplatten der Größe 20 x 20 cm ausgestrichen. Die frisch beschichteten Platten wurden zunächst vor einem Ventilator getrocknet und dann im Trokkenschrank 20 Minuten bei 120° C aktiviert. Um beim Chromatographieren störende Randefrekte zu vermeiden, wurden seitlich der Streichrichtung des Sorptionsbelages am Plattenrand 6 bis 10 mm breite Bänder abgestreift. Die Schichtdicke betrug bei analytischen Arbeiten 0,25 mm und für präparative Zwecke 0,4 mm.
Als Sorptionsmittel wurden Kieselgel G, Keiselgur G, Kieselgel G F_{254} (STAHL) und Kieselgur mit Fluoreszenz-Indikator benutzt. Da Kieselgur G F_{254} im Handel nicht erhältlich ist, wurde die Fluoreszenzsubstanz "Leuchtstoff Grün" der Fa. Woelm, Eschwege, dem Kieselgur G im Verhältnis 1:10 beigemischt. Der Vorteil der Fluoreszenzplatten gegenüber den einfachen DC-Platten besteht darin, daß sie bei kurzwelligem UV-Licht (254 nm) an den Stellen, an denen auf der Platte Gibberelline

adsorbiert sind, Auslöschungen zeigen. Diese Stellen können direkt unter UV-Licht markiert werden, was ein präzises Auskratzen der Gibberellin-Zonen ermöglicht. Als Chromatographierkammern dienten handelsübliche Aquarien verschiedener Größen, die jeweils 2 bis 4 DC-Platten aufnehmen konnten. Das Abdecken der Kammern erfolgte mit entsprechend geschnittenen Fensterglasplatten.

Entwicklungsgemische

Bei den dünnschichtchromatographischen Arbeiten wurden folgende Entwicklungsgemische angewandt (37, 55, 57):

Fließmittelgemisch I: Chloroform/Äthylacetat/Eisessig (60/40/5).

Dieses Laufmittel ermöglicht die Trennung der Gibberelline A_1 bis A_9 in Gruppen (s.Abb. Nr.1).
Diese liegen in vier Rf-Bereichen, die wir wie folgt bezeichnen:

1. Rf-Bereich A_8: mit A_2 und A_8.
2. Rf-Bereich A_3: mit A_1, A_3 und A_X.
3. Rf-Bereich A_5: mit A_4, A_5, A_6 u. A_7.
4. Rf-Bereich A_9: nur A_9.

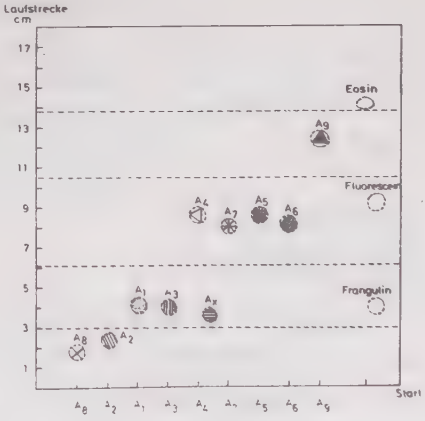


Abbildung Nr. 1
Gruppentrennung der Gibberelline A_1 - A_9 mit dem Laufmittel I

Fließmittelgemisch II: Chloroform/Äthylacetat/Eisessig (70/30/5).

Es dient zur Bestimmung der Rst-werte der Gibberelline A_1, A_2, A_3 und A_X (s.S. 30, 36).

Fließmittelgemisch III: Di-isopropyläther/Eisessig (95/5).

Es dient zur Bestimmung der Rf-Werte der Gibberelline A_1, A_3 und A_X (s.S. 37).

Fließmittelgemisch IV: Di-isopropyläther/Eisessig (98/2).

Dieses Laufmittel wird zur Bestimmung der Rf-Werte der Methylester benutzt (s.S. 50).

Fließmittelgemisch V: Benzol/Eisessig/Wasser (8/3/5).

Es ermöglicht die Auftrennung der Gibberelline A_5 und A_6 (s.S. 46).

Fließmittelgemisch VI: n-Propanol/5 N NH_3 (5/1)

Es findet bei der Auftrennung der butanollöslichen Gibberelline Verwendung (s.S. 59).

Markierungsfarbstoffe:

Bei den dünnschichtchromatographischen Arbeiten können Frangulin, Fluoreszein und Eosin als Markierungsfarbstoffe dienen. Mit ihrer Hilfe gelingt es, die Lage der Gibberelline auf der DC-Platte zu markieren (REINHARD, KONOPKA, SACHER 53). Bei Verwendung der Fließmittelgemische I und II stellt sich das Frangulin im Rf-Bereich der Gibberelline A_1 und A_3 ein, während Fluoreszein im Rf-Bereich von Gibberellin A_5 auftritt. Der Farbstoff Eosin dient zur Markierung der Front.

IV. Nachweis der Gibberelline.

Um den Erfolg der chromatographischen Trennungen nachzuweisen, müssen die Gibberelline auf den DC-Platten sichtbar gemacht oder auf ihre biologische Aktivität geprüft werden. Dazu dienen Sprühreagenzien und biologische Teste.

1. Sprühreagenzien.

Die Gibberelline werden nach Besprühen mit alkoholischer Kaliumpermanganat-Lösung (60 %-iges, wäßriges Äthanol mit wenig Kaliumpermanganat) und nach dem Trocknen auf der DC-Platte als gelbbraune Flecke sichtbar. Diese wurden unmittelbar nach ihrem Auftreten mit einer Nadel markiert. Beim Besprühen mit 70 %-iger, wäßriger Schwefelsäure geben sich die Gibberelline als fluoreszierende Flecke unter langwelligem UV-Licht (365 nm) zu erkennen. Diese erscheinen bei A_3 und A_7 sofort oder nach einminütigem Erhitzen, bei den übrigen hingegen erst nach 20-minütigem Erhitzen bei 120° C. Die im UV-Licht auftretenden Fluoreszenz-Farben können zur Charakterisierung der Gibberelline mit herangezogen werden

Gibberellin	Fluoreszenzfarbe nach H_2SO_4-Behandlung
A_1	blau
A_2	purpur
A_3	grünblau
A_4	purpur
A_5	blau
A_6	blau
A_7	rein
A_8	blau
A_9	purpur.

Die biologischen Teste.

Die Gibberelline liegen in den Pflanzen in so geringen Konzentrationen vor, daß chemische Nachweismethoden (23) zumeist nicht anwendbar sind. Zu ihrer Identifizierung müssen empfindliche biologische Teste herangezogen werden. Dazu können verschiedene biologische Reaktionen an diversen Blütenpflanzen benutzt werden (46).

Besonders eignen sich hierfür Zwergrassen von Pflanzen, bei denen der Zwergwuchs genetisch fixiert ist. Werden diese mit Gibberellin A_3 oder anderen Gibberellinen in angemessenen Mengen behandelt, so wird der Zwergwuchs aufgehoben und sie entwickeln sich wie normale Pflanzen (BRIAN et al. 4).

Als besonders geeignete Testpflanzen erwiesen sich Zwergformen von Erbsen (RADLEY 50) und Maismutanten (PHINNEY et al. 48). RADLEY (50) prüfte gibberellinartige Substanzen verschiedener Blütenpflanzen auf 14 Tage alten Zwergerbsen. REINHARD (52) verbesserte diesen Test, indem er 4 Tage alte Erbsenkeimlinge verwendete und dadurch einen Routinetest mit geringem Zeitaufwand entwickelte. Er legte im Test mit Zwergerbsen Progress Nr.9 und im Maistest mit den Mutanten d 1, d 2, d 3 und d 5 für die Gibberelline A_1 bis A_9 mit Hilfe statistischer Methoden ihre relativen Aktivitäten fest.

a) Der Zwergerbsentest:

In der vorliegenden Arbeit diente der Zwergerbsentest als qualitativer Routinetest zur laufenden Kontrolle der Isolierungs- und Reinigungsmethoden des Rohextraktes A und B. Er wurde wie folgt ausgeführt:

Samen der Zwergerbsenrasse Progress No. 9 wurden ca. 16 Stunden in Leitungswasser angequollen. Danach wurden sie in Pflanzschalen, die mit angefeuchtetem Vermiculit gefüllt waren, so ausgelegt, daß die Radicula senkrecht nach unten zeigte. Diese Orientierung der Samen war für den ungestörten, aufrechten Wuchs der Sprosse wichtig. Die Erbsen wurden, mit Vermiculit bedeckt, im Dunkeln bei 25° C in einer Klimakammer zur Keimung gebracht. Einmal pro Tag wurden die Schalen schwach bewässert. Sobald die Pflanzen nach etwa 4 bis 5 Tagen eine Höhe von ca. 2,0 bis 2,8 cm erreicht hatten, wurden Keimlinge gleicher Länge aus dem Vermiculit ausgelesen, vom Beginn des Epicotyls bis zum Ansatz des ersten Blattes auf ± 1 mm genau gemessen (s.Abb. Nr. 2), in durchlöcherte Deckel von Plastikschalen gesteckt und durch aufgestreutes Vermiculit senkrecht fixiert. Dabei waren die Öffnungen in den Deckeln so angeordnet, daß 4 Keimlinge in einer Reihe standen und jeder Kasten 12 Reihen zählte (s.Abb.Nr.3). Die Plastikbehälter waren bis zu 3/4 ihres Volumens mit Leitungswasser gefüllt.

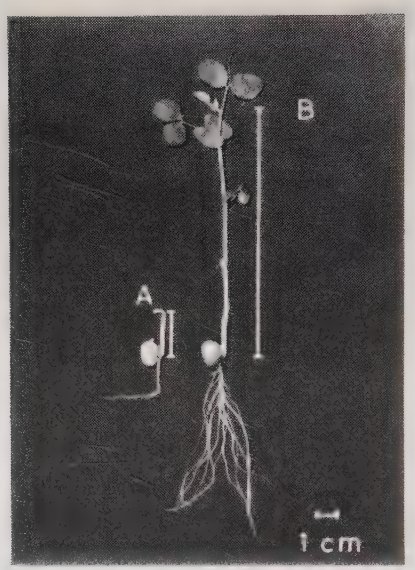


Abbildung Nr. 2: Zwergerbsen

A Meßstrecke vor Beginn des Testes.
B Meßstrecke am Ende des Testes nach 7 Tagen.

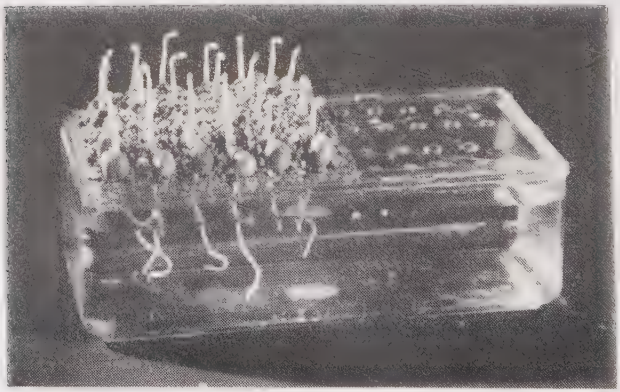


Abbildung Nr. 3: Vorbereitung eines Zwergerbsentestes.

Zur Anpassung an die geänderten Kulturbedingungen wurden die Keimlinge für 12 Stunden in eine dunkle Klimakammer gestellt, um dann bei Rotlicht mit den zu untersuchenden Lösungen beimpft zu werden. Die Extrakte wurden entweder in 0,05 %-iger, wäßriger Tween-20-Lösung (Tween-20 = Polyäthylenglykol-Sorbitanlaurat) oder, je nach ihrer Löslichkeit, in 60 %-igem Äthylalkohol aufgenommen. Mit Hilfe einer Hamilton-Mikrospritze wurden sie in Tropfen von 5 λ bis 20 λ auf die Knospen zwischen die Primärblätter appliziert.

Bei quantitativer Auswertung der biologischen Teste wurde zum Vergleich der biologischen Aktivität eine Gibberellin A_3-Konzentrationsreihe von 0,001 γ bis 0,1 γ aufgetragen. Die Dosiswirkungskurve einer Gibberellin A_3-Konzentrationsreihe auf Zwergerbsen veranschaulicht die Abbildung Nr. 4

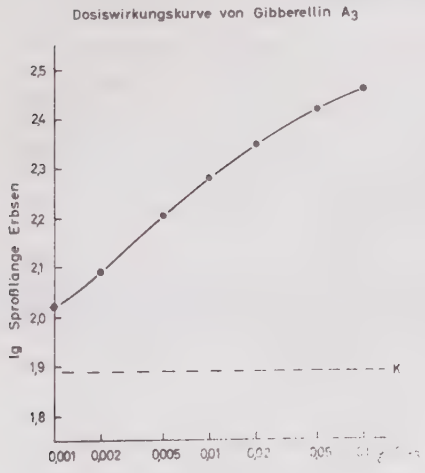


Abbildung Nr. 4:

Dosiswirkungskurve von Gibberellin A_3 auf Zwergerbsen Nr. 9.

Dauer des Versuchs: 8 Tage. Belichtung 2 x 3 Stunden innerhalb von 24 Stunden.

Die beimpften Keimlinge wurden anschließend zur weiteren Kultur in der Klimakammer belassen und innerhalb von 24 Stunden 3 mal 2 Stunden mit schwachem Rotlicht beleuchtet. Die Temperatur betrug 25° C, die relative Luftfeuchtigkeit ca. 70 %. Die Verwendung von Rotlicht geht auf LOCKHART (31) zurück, der fand, daß die Hemmung des Sproßwachstums infolge Hellrotlicht durch Gibberellingaben aufgehoben wird. Das Rotlicht wurde von einer Leuchtstoffröhre (Osram L 40 W/22) erzeugt, die mit einer 0,25 mm dicken, roten Astralon-Folie (Nr. A 757, Dynamit AG, Troisdorf) bezogen war.

Am achten Tag nach dem Applizieren der Testlösungen wurden die Sproßlängen vom Beginn des Epicotyls bis zur Basis der nicht entfalteten Blätter gemessen (s.Abb. Nr.2)

Die Mittelwerte der Sproßlängen von jeweils vier Erbsen einer Reihe bildeten die Meßwerte, die zur Erstellung von Diagrammen verwertet wurden.

Der Zwergmaistest:

Zur Bestimmung der relativen Aktivität der isolierten Gibberelline wurden außer Zwergerbsentesten auch Zwergmaisteste ausgeführt. Die durch Gibberellin A_3 hervorgerufene Verlängerung der 1. und 2. Blattscheide diente als Bezugsgröße.

Der Mais-Test wurde nach PHINNEY (44) wie folgt ausgeführt:

Die Früchte der Zwergmais-Mutanten d 1 und d 5 wurden ca. 12 Stunden in Leitungswasser zur Quellung gebracht, in Vermiculit ausgesät und in der Klimakammer bei einem Licht-Dunkel-Wechsel von 12 Stunden und einer Temperatur von 25° C ausgekeimt. Da das Saatgut sowohl Zwerg- als auch Normalformen enthielt, wurden nach 8 bis 10 Tagen die Zwergmais-Mutanten ausgelesen und in Vermiculit umgepflanzt. Die zu untersuchenden Extrakte wurden in 0,05 %-iger, wäßriger Tween-20-Lösung aufgenommen (s.S. 51) und ein Teil davon mit Hilfe der Hamilton-Mikrospritze in die erste Blattscheide gegeben. Für jeden Extrakt wurden jeweils vier Maispflanzen einer Mutante benutzt. Als Kontrolle dienten je vier nur mit Tween-Lösung behandelte Pflanzen. Während des Testes lieferten 5 Leuchtstoff-Röhren (Osram L 40 W/22) helles Dauerlicht. Die Kammertemperatur wurde auf ca. 25° C gehalten und die Schalen einmal am Tag schwach gegossen. Am 9. Tag nach dem Auftragen wurden die Längen der ersten und zweiten Blattscheide gemessen, addiert und aus den Summen der Additionswerte von jeweils vier Testpflanzen der Mittelwert berechnet.

c) Statistische Auswertung der biologischen Versuche:

Die isolierten biologisch aktiven Substanzen wurden in quantitativen Testen auf Zwergerbsen und Zwergmais-Mutanten appliziert, um einen Vergleich ihrer biologischen Aktivitäten mit Gibberellin A_3 zu ermöglichen. Diese ver-

gleichenden biologischen Teste dienten der Bestimmung der relativen Aktivität.

Unter relativer Aktivität versteht man das Verhältnis der biologischen Aktivität der isolierten Substanz, bezogen auf die biologische Aktivität von Gibberellin A_3 als Standard mit dem Wert 1.

Um über den Wert eines biologischen Testes entscheiden zu können, müssen die Meßwerte einer statistischen Analyse unterworfen werden. Diese Art der Analyse geht auf die Methoden für biologische Bestimmungen von Vitaminen zurück, wie sie von BLISS (1) und EMMENS (13) dargelegt worden sind. Speziell für Gibberellinteste wurde eine Reihe solcher Methoden von NEELY (41) zusammengestellt, dessen Arbeit auch den vorliegenden Untersuchungen zugrunde gelegt wurde.

Zur Durchführung einer statistischen Auswertung der biologischen Teste wurden die zu untersuchenden gibberellinartigen Substanzen in 0,05 %-iger, wäßriger Tween-Lösung auf die Testpflanzen appliziert:

1. In zwei Konzentrationen (U_1 und U_2).
2. In einer Konzentration (U).

ad 1) Als Bezugsgrößen dienten zwei Konzentrationen (S_1 und S_2) von Gibberellin A_3, die untereinander im Verdünnungsverhältnis 1:10 standen. Im gleichen Verdünnungsverhältnis wurde die zu untersuchende Lösung bereitet und auf je 4 Testpflanzen aufge-

tragen. Nach dem Ausmessen der Testpflanzen erhält man vier Reihen von Meßwerten, die einer Varianzanalyse unterworfen werden. Komponenten der Varianz sind der Unterschied zwischen S_1-S_2 einerseits, sowie U_1-U_2 andererseits, weiter die Steigung zwischen den jeweiligen Konzentrationen sowie die Divergenz zwischen S_1-S_2 sowie U_1-U_2. In einem F-Test (58) wurden diese Größen auf Signifikanz geprüft. Dabei wird ein Test als gültig betrachtet, wenn der Varianz-Quotient für die Steigung signifikant und für die Divergenz nicht signifikant ist (Der Tabellenwert des Varianz-Quotienten bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 betragt 9,3).

ad 2) Als Bezugsgrößen dienten drei verschiedene Konzentrationsstufen (S_1, S_2 und S_3) von Gibberellin A_3, die untereinander im Verhältnis 1:10:100 verdünnt waren. Der zu untersuchende Extrakt stand nur in einer Konzentration zur Verfügung. Diese Versuchsanordnung ist in ihren Ergebnissen weniger zuverlässig, muß jedoch gewählt werden, wenn die zu untersuchende gibberellinartige Substanz nur in geringen Mengen vorhanden ist.

E r g e b n i s s e

1. Die äthylacetatlöslichen Gibberelline (Rohextrakt A).

1) Gruppentrennung.

Ein Vortest zeigte, daß die Aktivität des Rohextraktes A auf der Kieselgel G DC-Platte unter Verwendung des Fließmittels I bei aufsteigender Chromatographie in zwei wachstumsfördernde Zonen aufgetrennt werden kann (s.Abb. Nr.5).

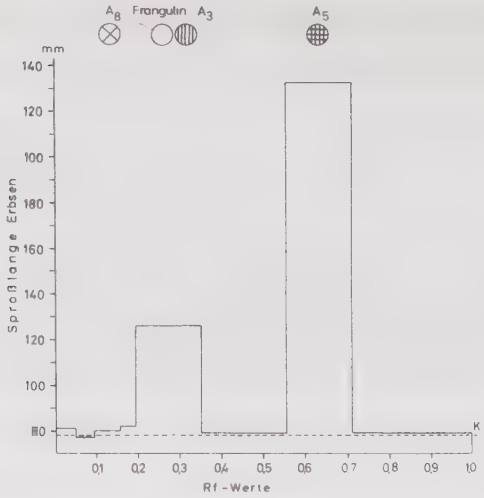


Abbildung Nr. 5:
Biologische Auswertung einer DC-Trennung des Rohextraktes A.

Bei dieser Auftrennung wurden neben dem Rohextrakt A die Gibberelline A_3, A_5 und A_8 sowie Frangulin als Vergleichssubstanzen mitaufgetragen. Die Laufzeit betrug ca. 3 1/2 Stunden.

Nach beendeter Chromatographie wurden die Vergleichs-gibberelline mit alkoholischer Permanganatlösung sichtbar gemacht und die DC-Platte gemäß den Positionen der Gibberelline in Zonen aufgeteilt. Diese Zonen wurden von der Platte entfernt, mit Aceton eluiert und die so gewonnenen Extrakte im Zwergerbsentest auf ihre biologische Aktivität untersucht. Es zeigte sich, daß die Aktivitäten im Rf-Bereich A_3 und besonders im Rf-Bereich A_5 auftraten, während der Rf-Bereich A_8 keine wachstumsfördernde Wirkung aufwies. Auch oberhalb des Rf-Bereichs A_5 fehlte jede Spur einer biologischen Aktivität, sodaß auf die Abwesenheit von Gibberellin A_9 geschlossen werden konnte.

Die gute Auftrennung des Rohextraktes A auf der Kieselgel G DC-Platte mit dem Fließmittel I veranlaßte mich, den gesamten Rohextrakt A dünnschichtchromatographisch praparativ aufzuarbeiten. Zu diesem Zweck wurde der Extrakt A in einer Menge von 0,3 bis 0,35 ml mit einer Mikrospritze in Form eines Bandes und in einem Abstand von 2 cm vom unteren Rand aufgetragen. Links und rechts der Auftragstelle wurde Platz für die Farbstoffe Frangulin und Eosin ausgespart, die als Begleitsubstanzen gleichzeitig aufgegeben wurden. Diese Farbstoffe dienten zur Orientierung beim Einteilen der Rf-Bereiche.

Frangulin markiert den Rf-Bereich A_1 und A_3, während die Zone unterhalb davon den Rf-Bereich A_8 und oberhalb den Rf-Bereich A_5 darstellt.

Eosin markiert die Fließmittelfront (s.Abb. Nr.6).

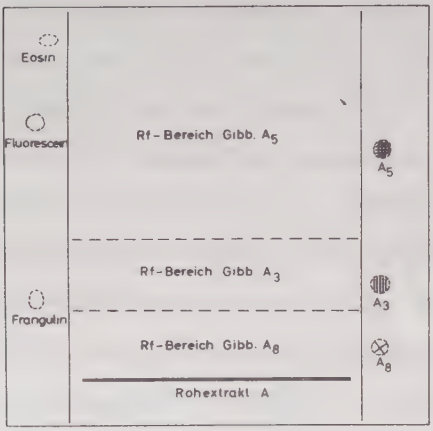


Abbildung Nr. 6:
Gruppentrennung des Rohextraktes A
Fließmittel II

Der gesamte Rohextrakt A wurde auf diese Weise dünnschichtchromatographisch präparativ auf 330 DC-Platten aufgetrennt.

2) Untersuchung der Gibberelline im Rf-Bereich von Gibberellin A_3

Wie oben gezeigt, können die Gibberelline des Rohextraktes A in Gruppen aufgetrennt werden. In der Folge soll festgestellt werden, welche biologisch aktiven Substanzen in den verschiedenen Rf-Bereichen enthalten sind. Dazu wurden die einzelnen Bereiche von der Platte abgestreift und auf Glanzpapierbögen aufgefangen. Das Kieselgel der

verschiedenen Zonen wurde in Erlenmeyerkolben gesammelt, in Aceton aufgeschwemmt und eluiert.

Als erstes unterzog ich den Rf-Bereich von Gibberellin A_3 einer näheren Untersuchung. Dabei wurde eine Probe dieses Extraktes, in Aceton gelöst, auf einer Kieselgel G DC-Platte mit dem Fließmittel I zweimal chromatographiert. Die Gesamtlaufzeit betrug 7 Stunden. Nach dem Besprühen der ganzen DC-Platte mit 70 %-iger, wäßriger Schwefelsäure war Gibberellin A_3, das als Reinsubstanz mitaufgetragen war, sofort an seiner grünen Fluoreszenzfarbe unter dem UV-Licht (Wellenlänge 365 nm) zu erkennen, während sich im Extrakt erst nach 20-minütigem Erhitzen bei 120° C eine blaue Fluoreszenz in geringem Abstand unterhalb von A_3 zeigte (s.Abb. Nr.7).

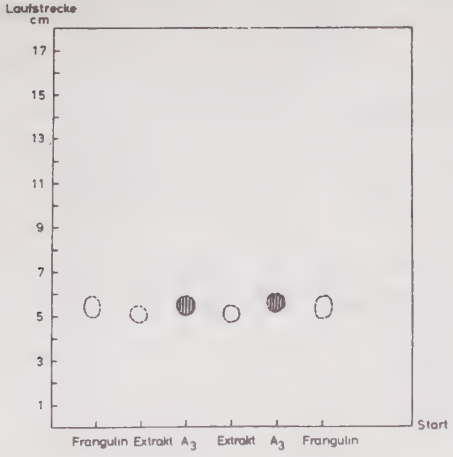


Abbildung Nr. 7:
Chromatogramm des Extraktes aus dem Rf-Bereich Gibberellin A_3 mit dem Fließmittel I

Da aus anderen Chromatogrammen mit Gibberellin A_1 als Reinsubstanz bekannt war, daß A_1, unter gleichen Bedingungen wie oben ausgeführt, durch seine blaue Fluoreszenz oberhalb von A_3 sichtbar wird, war zu vermuten, daß hier eine neue Substanz (A_X) mit zwar gleichfarbiger Fluoreszenz wie A_1, aber mit anderen Wanderungseigenschaften vorliegt.

Diese Vermutung wurde durch folgenden Versuch bestätigt, bei dem unter Verwendung des Fließmittels II und dreimaligem Chromatographieren der gleichen Platte eine bessere Trennung des Extraktes erzielt wurde. Außerdem wurde noch Gibberellin A_3 zum Vergleich herangezogen. Die neue Substanz stellte sich unterhalb von A_1 und A_3 ein. Auch die Reinsubstanzen zeigten eine deutliche Trennung voneinander, wobei A_1 oberhalb von A_3 und A_X wanderte (s.Abb. Nr.8).

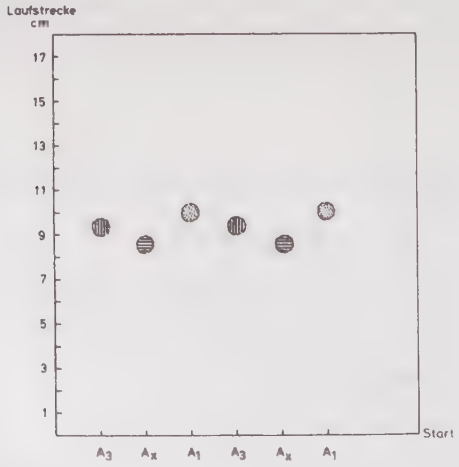


Abbildung Nr.8:
Chromatogramm der Substanz A_X mit dem Fließmittel II

Im Anschluß an dieses Ergebnis wurde ein Erbsentest ausgeführt, um festzustellen, ob die noch unbekannte Substanz biologische Aktivität besitzt.

Zu diesem Zweck wurde eine Probe des Extraktes unter Verwendung des Fließmittels II dreimal auf der gleichen Platte chromatographiert. Daneben liefen zum Vergleich der Gibberelline A_1 und A_3. In der Mitte der Startlinie wurde der auf seine biologische Aktivität zu untersuchende Extrakt aufgetragen, während links davon die Gibberelline A_1 und A_3 sowie eine Probe des Extraktes, rechts hingegen nur die Gibberelline A_1 und A_3 aufgegeben wurden. Nach beendeter Chromatographie wurde die rechte Seite der DC-Platte mit alkoholischer Kaliumpermanganat-Lösung besprüht. Die Vergleichsgibberelline A_1 und A_3 ergaben auf dem Chromatogramm gelbe Flecke. Den Positionen dieser Gibberelline entsprechend wurde der Mittelstreifen in 22 je 2 mm breite Zonen eingeteilt, diese ausgekratzt und mit Aceton eluiert. Diese kleine Unterteilung wurde vorgenommen, um auch nahe beieinanderliegende, biologisch aktive Substanzen noch getrennt voneinander erfassen zu können. Die Extrakte der einzelnen Zonen wurden im Zwergerbsentest auf ihre biologische Aktivität untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die neue gibberellinartige Substanz im Chromatogramm dicht unterhalb von Gibberellin A_3 wanderte (s.Abb. Nr.9).

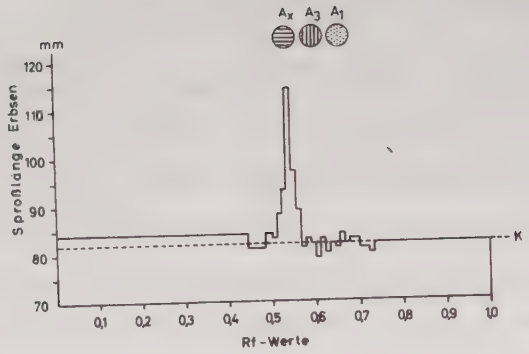


Abbildung Nr. 9:

Biologische Auswertung einer DC-Trennung der biologisch aktiven Substanz A_X aus dem Rf-Bereich A_3. Biologische Aktivität nachgewiesen im Zwergerbsentest. Im oberen Teil der Abbildung ist die Lage der Vergleichssubstanzen, die auf der gleichen Platte mitchromatographiert wurden, angegeben.

Nachdem die Zonen für den biologischen Test von der Platte entfernt worden waren, wurde die linke Seite des Chromatogramms mit den Gibberellinen A_1 und A_3 sowie dem Extrakt mit 70 %-iger, wäßriger Schwefelsäure entwickelt. Die unbekannte Substanz trat auch hier unterhalb von A_1 und A_3 auf, und zwar entsprechend der Position, an der sie auf der linken Seite des Chromatogramms aufgetreten war.

Diese Voruntersuchungen gaben einen deutlichen Hinweis dafür, daß es sich bei der noch unbekannten Substanz um einen gibberellinartigen Stoff (A_X) handelt. Außer A_X konnten im Rf-Bereich von A_3 keine weiteren Gibberelline gefunden werden.

a) Isolierung von Gibberellin A_X.

Zur weiteren Reinigung und Isolierung der Substanz A_X wurden folgende vier Verfahren angewandt:

1) Reinigung durch Dünnschichtchromatographie:

Da der aus dem Rf-Bereich A_3 hervorgegangene Extrakt immer noch Verunreinigungen aufwies, reinigte ich ihn erneut auf 75 DC-Platten nach der oben geschilderten, präparativen Methode (s.S. 26). Ein Erbsentest bestätigte die richtige Einteilung der DC-Platten in drei Zonen, von denen nur die mittlere (= Rf-Bereich A_3) biologische Aktivität zeigte (s.Abb. Nr.10).

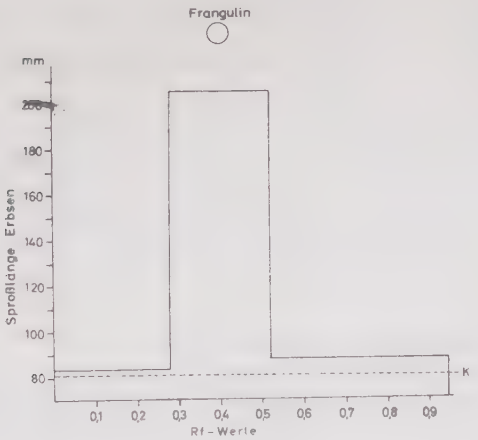


Abbildung Nr. 10:
Biologische Auswertung einer erneuten dünnschichtchromatographischen Trennung des Extraktes aus dem Rf-Bereich A_3.

2) Reinigung durch eine Celite-Silicagel-Säule:

Der weiteren Reinigung und Anreicherung des Gibberellins

A_X diente die Celite-Silcagel-Säule (Verfahren s.S.). Zu diesem Zwecke wurde der gesamte Extrakt A_X (=1,2 g) an 4,0 g Silicagel M.F.C. adsorbiert und gleichmäßig auf zwei Säulen verteilt. Wie aus dem biologischen Test hervorgeht, traten die Aktivitäten in den Fraktionen von 20 bis 50 % Äthylacetat auf. Im Chromatogramm zeigten diese Fraktionen nach Behandlung mit Schwefelsäure und Erhitzen bei 120° C unterhalb des mitaufgetrennten Gibberellins A_3 eine blaue Fluoreszenz. Die Abbildung Nr.11 veranschaulicht die biologischen Aktivitäten dieser Fraktionen im Zwergerbsentest.

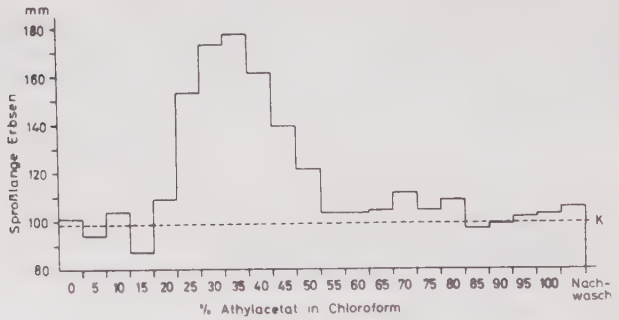


Abbildung Nr. 11:
Verteilung der biologisch aktiven Substanz A_X auf einer Celite-Silicagel-Säule. Nachweis der biologischen Aktivität im Zwergerbsentest.

Reinigung mit Hilfe von Kieselgel G-Fluoreszenzplatten:
Da die mit der Celite-Silicagel-Säule erzielte Reinigung nicht ausreichen war, wurden die letzten Verunreinigungen auf dünnschichtchromatographischem Weg mit Kieselgel G-Fluoreszenz-Platten beseitigt. Dabei wurden die biolo-

gisch aktiven Fraktionen der beiden Celite-Silicagel-Säulen vereinigt und auf ca. 10 Kieselgel G F_{254} DC-Platten in Bandform aufgetragen. Sie wurden entsprechend dem Rohextrakt A chromatographiert (s.S. 26). Gibberellin A_3 diente als Vergleichssubstanz. In Höhe dieser Reinsubstanz trat unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm in einer schmalen Zone Auslöschung ein, die direkt unter UV-Licht mit einer Nadel markiert wurde. Dieses schmale Band wurde von der Platte vorsichtig entfernt und mit Aceton eluiert. Die Lösung enthielt, wie ein Chromatogramm bestätigte, nur noch Gibberellin A_X.

4) Isolierung des Gibberellins A_X durch Fällung mit Petroläther-Lösung:

Die aus Reinigungsmethode 3) erhaltene, in einem Spitzkolben zur Trockne eingeengte Substanz A_X wurde in 2 ml Äthylacetat gelöst und tropfenweise mit ca. 20 ml Petroläther versetzt. Sofort trat eine weiße Trübung auf, die sich an der Glaswand als amorpher Niederschlag absetzte. Die Mutterlauge wurde abdekantiert, der Niederschlag mit weiteren 10 ml Petrolätherlösung nachgewaschen und in Aceton aufgenommen. Eine Probe dieser Lösung wurde auf einer Kieselgel G DC-Platte mit dem Fließmittel I chromatographiert und nach Sichtbarmachung der Substanz mit Schwefelsäure die Identität von Gibberellin A_X festgestellt.

Zur näheren Charakterisierung des neu isolierten Gibberellins A_X, das nur in geringen Mengen vorlag, wurden verschiedene Methoden angewandt:

1. Die Bestimmung der Rst- und Rf-Werte.
2. Die Erstellung eines IR-Spektrums.
3. Die Erstellung eines Emissionsspektrums.

b) Bestimmung der Rst- und Rf-Werte.

Die Ermittlung der Rst- und Rf-Werte für die gibberellinartige Substanz A_X - und vergleichsweise dazu auch für die Gibberelline A_1 und A_3 - erfolgte auf Kieselgel G DC-Platten der Schichtdicke 0,25 mm unter Anwendung der Fließmittelsysteme II und III, Nach beendeter Chromatographie wurden die DC-Platten mit 70 %-iger, wäßriger Schwefelsäure besprüht und umgehend unter UV-Licht (Wellenlänge 365 nm) betrachtet. Bekanntlich fluoresziert dann Gibberellin A_3 sofort, während die blaue Fluoereszenz von A_X und Gibberellin A_1 erst nach 20 bis 25-minütigem Erhitzen bei 120° C auftritt (s.S. 17).

Mit dem Fließmittel II wurden für A_X und die Gibberelline A_1 und A_3 nach wiederholter Bestimmung folgende Rst-Werte (Rf A_3 = 1,00) ermittelt:

	A_X	A_1	A_3
Rst	0,92	1,07	1,00

Die Chromatographie wurde viermal an der gleichen Platte wiederholt. Die Gesamtlaufzeit betrug ca. 14 Stunden.

Mit dem Fließmittel III wurden nach mehrmaliger Bestimmung folgende Rf-Werte bestimmt:

	A_1	A_3	A_X
Rf	0,108	0,108	0,06

Die Laufzeit betrug 2 bis 2 1/2 Stunden. Die Fließmittelfront erreichte 15 cm Plattenhöhe. Die Wanderungseigenschaften der biologisch wirksamen Substanz A_X sind also auf DC-Platten bei Verwendung unterschiedlicher Laufmittel deutlich verschieden von denen der Gibberelline A_1 und A_3.

c) IR-Spektrum.

Eine weitere Charakterisierung der Substanz A_X wurde durch das IR-Spektrum versucht.
Dabei wurde das nur in geringer Menge vorhandene A_X in Aceton-Lösung auf 200 mg KBr aufgebracht. Mögliche Spuren von Aceton und Feuchtigkeit wurden während 20 Stunden in der Gefriertrocknungsanlage vollstandig entfernt. Das IR-Spektrum der Substanz A_X, aufgenommen[+] mit dem IR-Spektrographen IR-10 der Fa. Beckman-Instru-

[+] Herrn J. Markert, Institut für Organische Chemie, Würzburg sei für die Aufnahme des IR-Spektrums, Herrn Professor Dr. Fahr für seine Mithilfe bei der Diskussion herzlich gedankt.

ments, München, zeigt folgende charakteristische Absorptionen:

Die starke Bande bei 3400 cm^{-1} (2,94 µ) dürfte der OH-Valenz-Schwingung, die bei 1760 cm^{-1} (5,68 µ) der 5-Ring-Lacton-Gruppierung zuzuordnen sein. Die Banden sprechen für das Vorliegen der angenommenen Gibban-Struktur (s.Abb. Nr.12).

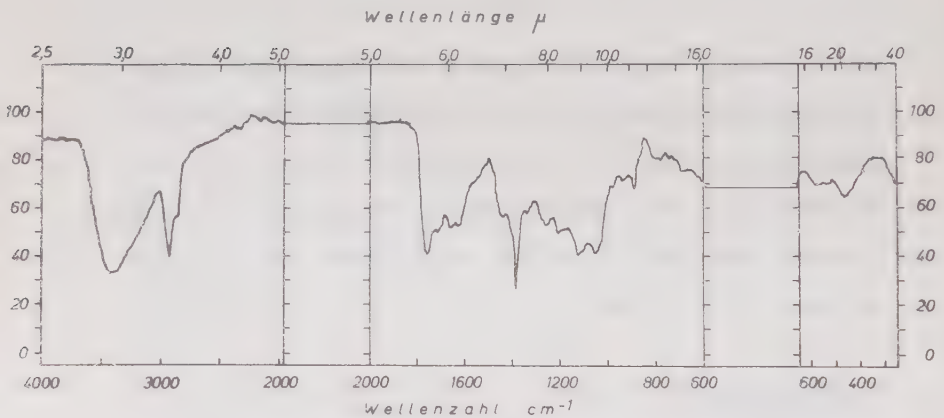


Abbildung Nr. 12:
IR-Spektrum der Substanz A_X.

Da die Befunde vermuten lassen, daß bei der Substanz A_X Strukturähnlichkeiten mit Gibberellin A_2 vorliegen, wurden zwei Vergleichschromatogramme mit Gibberellin A_2 hergestellt. Aus den schematischen Darstellungen dieser Chromatogramme jedoch ist klar ersichtlich, daß es sich bei A_X nicht um A_2 handeln kann (s. Abb. Nr. 14 u. 15). Das Gibberellin A_2 zeigt außerdem beim Besprühen mit

70 %-iger Schwefelsäure und nach 20-minütigem Erhitzen der DC-Platten auf 120° C eine purpurne Fluoreszenz.

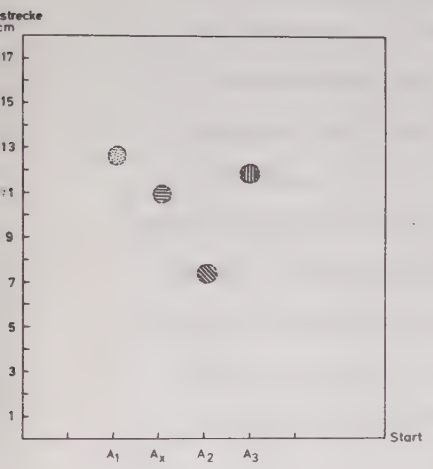


Abbildung Nr. 14:
Chromatogramm der Gibberelline A_1, A_2, A_3 und A_X mit dem Fließmittelgemisch II.

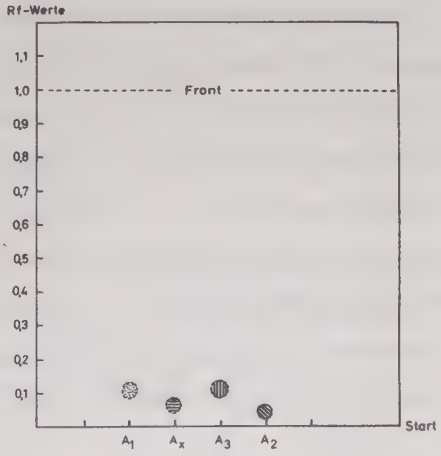


Abbildung Nr. 15:
Chromatogramm der Gibberelline A_1, A_2, A_3 und A_X mit Fließmittelgemisch III.

d) Emissions-Spektrum.

Aufgrund der nahe beieinanderliegenden Rst- und Rf-Werte von A_X und der Gibberelline A_1 und A_3, sowie der ähnlichen Fluoreszenz im UV-Licht nach Schwefelsäurebehandlung, wurden zur näheren Charakterisierung von A_X Vergleichsspektren von A_3 und A_1 angefertigt+. Als Anregungslicht diente eine Xenon-Hochdrucklampe (SBO 501, Fa. Osram), die im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich ein nahezu linienfreies Conti-

+ Herrn D. Wolf, Institut für Physikalische Chemie, Würzburg, sei für die Erstellung der Emissions-Spektren und Herrn Dr. W. Liptay für wichtige Hinweise gedankt.

nuum emittiert. Ein Doppelmonochromator (M M 12, Fa. Carl Zeiss) selektierte aus dem Gesamtspektrum der Xenon-Lampe das erforderliche Anregungslicht, welches vor dem Auftreffen auf die zu messende Probe auf 125 Herz moduliert wurde. Das entstehende Fluoreszenz-Licht ging über einen zweiten Doppelmonochromator (M M 12, Fa. Carl Zeiss) in einen Photomultiplier (R C A 1 P 28), dessen Versorgungsspannung ein stabilisiertes Hochspannungsgerät (Fa. R. Glier, Schweinfurt) lieferte, und weiter über einen Niederfrequenz-Selektivverstärker (Fa. R. Glier, Schweinfurt) zu einer registrierenden Meßbrücke (Philipps, P R 2210).

Vorbehandlung der Gibberelline zur Messung.

Bei der Bereitung der Proben wurde wie folgt verfahren: 100 γ Gibberellin A_3, 50 γ Gibberellin A_1 und eine Probe von A_X wurden in 0,5 ml absolutem Äthanol aufgenommen, mit der gleichen Menge konzentrierter Schwefelsäure versetzt und umgeschüttelt. Die Gibberellin-A_3-Lösung wurde in einem auf 50° C erwärmten Wasserbad durch 30-minütiges Erhitzen zu fluoreszierenden Fluoren-Derivaten abgebaut. Die Gibberelline A_1 und A_X reagierten unter diesen Bedingungen nur wenig. Erst ein einstündiges Erhitzen im Trockenschrank bei 100° C führte zum Abbau und damit zu einer Fluoreszenz.

Graphische Darstellung der Emissions-Spektren

(s. Abb. Nr. 13).

Die registrierten Spektren wurden so korrigiert, daß die Ordinate der Intensität (Dimension: Quanten pro Sekunde) proportional ist. Der zur Korrektur der registrierenden Spektren notwendige wellenlängenabhängige Faktor wurde für die benutzte Apparatur mit Hilfe von Eichlampen bestimmt. Durch additives Beifügen einer Konstanten zur Ordinatenfunktion läßt sich jedes Spektrum auf jeden beliebigen Ordinatenabstand so festlegen, daß Vergleiche bezüglich der Bandenverschiebung und Bandenstruktur übersichtlicher anzuordnen sind. Für die Abszisse wurde statt der Wellenlänge die Wellenzahl benutzt, weil sie den adsorbierten Energiebeträgen unmittelbar proportional ist. Die Wellenlänge 1 cm (10 000 µ) entspricht der Wellenzahl 1 cm^{-1}. Die Dimension cm^{-1} wird auch als Kayser (K) bezeichnet.

Zusammenfassung der Meßergebnisse:

Giboerellin	Konzentration	Anregungslicht	Bandenmaximum
A_1	50 γ	418 mµ	418 mµ ± 5
A_3	100 γ	418 mµ	467 mµ ± 5
A_x	unbest.Menge	418 mµ	464 mµ ± 5

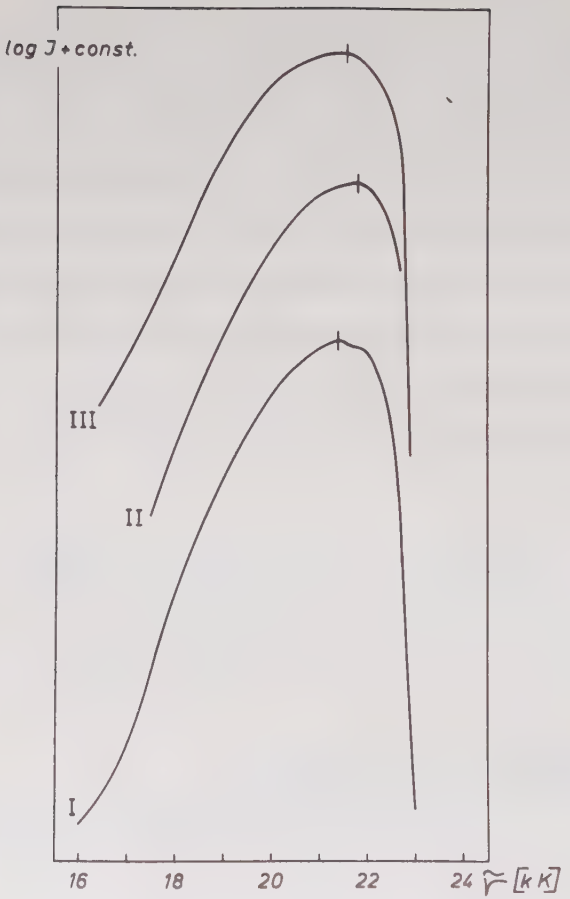


Abbildung Nr. 13:
Emissionsspektren der Gibberelline A_1, A_3 und A_X

I : Gibberellin A_3
II : Gibberellin A_X
III : Gibberellin A_1

Deutung der Emissionsspektren.

Die wie oben beschrieben vorbehandelten Lösungen wurden mit Licht angeregt, dessen Banden-Maximum bei 418 mμ lag. Die Lage der Emissions-Maxima und die Bandenstruktur der Fluoreszenz (s.Abb. Nr. 13) deuten darauf hin, daß es sich bei A_X um eine gibberellinartige Substanz mit gleicher Gibban-Struktur handeln muß wie bei Gibberellin A_1 und A_3.

3) Untersuchung der Gibberelline im Rf-Bereich A_5.

Wie aus der Voruntersuchung ermittelt wurde (Abb. Nr.5), trat die Hauptaktivität des Rohextraktes A im Rf-Bereich A_5 auf.

Die genaue Lage dieser biologischen Aktivität auf der DC-Platte wurde in einem Vortest bestimmt. Dabei wurde an zwei nebeneinanderliegenden Stellen in der Mitte der Startlinie einer Kieselgel G DC-Platte eine Probe des Extraktes vom Rf-Bereich A_5 aufgetragen, links und rechts davon Gibberellin A_5 sowie die Markierungsfarbstoffe Erangulin und Fluorescein. Die Laufzeit betrug 5 1/2 Stunden. Nach der Auftrennung mit dem Fließmittel 1 wurde das rechte Drittel der DC-Platte mit alkoholischer Permanganat-Lösung besprüht und die Positionen der beiden Gibberelline markiert. Entsprechend der Lage von Gibberellin A_5 sowie wenig oberhalb und unterhalb davon wurde die Schicht der Platte in 2 mm breite Querstreifen eingeteilt.
(s. Abb. Nr. 16)

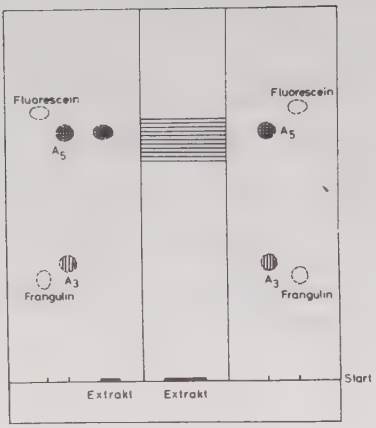


Abbildung Nr. 16:
Dünnschichtchromatographische Voruntersuchung zur Bestimmung der Position der biol. aktiven Substanz aus dem Extrakt des Rf-Bereiches A_5.

Alle Zonen wurden von der DC-Platte entfernt, mit Aceton eluiert und im Erbsentest auf ihre biologische Aktivität untersucht (s. Abb. Nr. 17). Die linke Plattenhälfte wurde mit 70 %-iger, wäßriger Schwefelsäure besprüht und nach dem Erhitzen auf 120° C die Fluoreszenz der Gibberelline A_3 und A_5, sowie die des Extraktes festgestellt. Dabei erschien die blaue Fluoreszenz des Extraktes in gleicher Höhe mit Gibberellin A_5. Wie aus der Abbildung Nr. 19 zu ersehen ist, trat die Hauptaktivität des Extraktes in Höhe von A_5 wenig unterhalb von Fluoreszein auf.

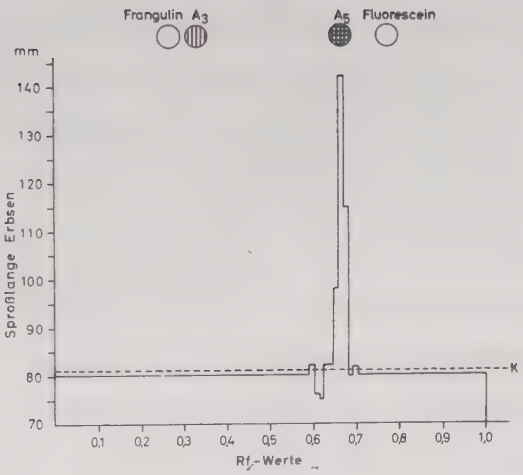


Abbildung Nr. 17:
Erbsentest zur Ermittlung der biologischen Aktivität des Extraktes aus dem Rf-Bereich A_5.

Da der Extrakt noch Verunreinigungen aufwies, wurde er zur weiteren Reinigung dünnschichtchromatographisch präparativ auf 70 Kieselgel G DC-Platten mit dem Fließmittel I chromatographiert. Dabei wurde der Rf-Bereich A_5 zwischen Fluoreszein und Frangulin gesondert von den Platten entfernt. Die von diesem Bereich obernalb und unterhalb gelegenen Zonen konnten verworfen werden. Die von allen Platten gesammelten Kieselgelstreifen des oben genannten Rf-Bereiches wurden mit Aceton eluiert und ergaben nach dem Einengen einen Extrakt, der auf 12 Kieselgel G F_{254} DC-Platten einer letzten Reinigung unterzogen wurde (entsprechend Seite 35).

Um im vorliegenden Extrakt über die Anwesenheit bzw. das Fehlen von Gibberellin A_6 entscheiden zu können, wurde er auf Kieselgur G-Platten mit dem Fließmittel V untersucht. Diese Methode wurde gewählt, da genanntes Fließmittel auf Kieselgur G-Platten eine bessere Trennung der Gibberelline A_5 und A_6 ermöglicht, als dies mit dem Fließmittel I auf Kieselgel G-Platten der Fall ist. Bei der Ausführung wurde eine Probe des Extraktes auf eine Kieselgur G-Platte der Schichtdicke 0,25 mm mit Gibberellin A_5 als Vergleichssubstanz aufgetragen. Die Unterphase des Fließmittels V wurde zur Kammersättigung benutzt. Die für die Chromatographie vorbereitete DC-Platte wurde zunächst eine Stunde lang in die gesättigte Kammer gestellt, bevor die Oberphase des Fließmittels mittels eines Scheidetrichters durch eine Öffnung der Deckplatte zugegeben wurde. Die Laufzeit betrug ca. 1 Stunde, in der die Fließmittelfront eine Höhe von 15 cm erreichte. Der nach Besprühen mit Schwefelsäure auf der Kieselgel G-Platte sichtbar gewordene blaue Fleck des Extraktes wurde in zwei blaue Fluoreszenzen aufgetrennt, die sich dadurch unterschieden, daß die obere mit dem Vergleichsgibberellin A_5 gleichlief, während sich die zweite weiter unterhalb einstellte. Die Substanzen hatten folgende Rf-Werte (s.Abb. Nr. 18):

A_5 (Vergleichssubstanz)	A_5 (gefunden)	A_6 (gefunden)
0,91	0,92	0,80

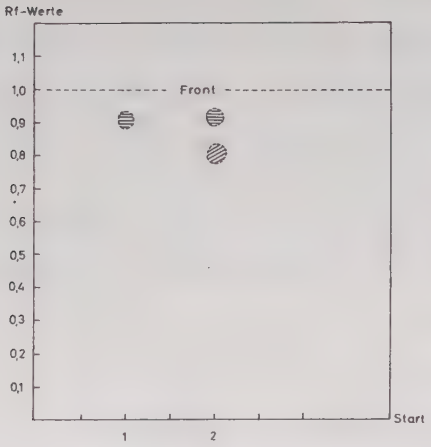


Abbildung Nr. 18:

Chromatogramm des vorgereinigten Extraktes aus dem Rf-Bereich A_5 mit dem Entwicklungsgemisch V.

1 = Vergleichssubstanz A_5
2 = Extrakt Rf-Bereich A_5

Die Ermittlung der Rf-Werte mit dem Fließmittel V auf Kieselgur G-Platten entsprach der Methode von MACMILLAN und SUTER (37). Die für Gibberellin A_5 und A_6 erhaltenen Werte jedoch lagen relativ höher als die von diesen Autoren angegebenen (RfA_5 = 0,88; RfA_6 = 0,75), stimmten aber in ihrem Verhältnis zueinander überein. Aus diesem Grund kann auf die Anwesenheit von Gibberellin A_6 neben A_5 geschlossen werden, obgleich eine Vergleichssubstanz von A_6 nicht vorlag. Außerdem konnte die Identität von A_5 noch durch ein Mischchromatogramm mit der Vergleichssubstanz bewiesen werden.

Zur Untersuchung der gefundenen Gibberelline A_5 und A_6 auf ihre biologische Aktivität wurde in einem weiteren Chromatogramm auf einer Kieselgur G-Platte eine erneute Auftrennung des Extraktes vorgenommen, entsprechend Seite 46. Die Abbildung Nr. 19 veranschaulicht das Ergebnis: Eine wachstumsfördernde Wirkung stellt sich in Höhe von Gibberellin A_5 ein, eine weitere tritt im Rf-Bereich von A_6 auf, entsprechend der blauen Fluoreszenz unterhalb von A_5.

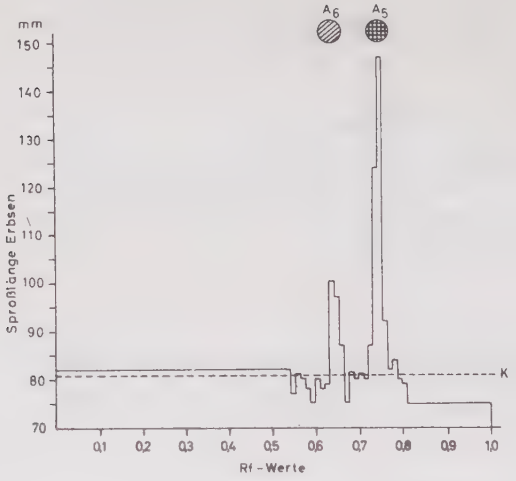


Abbildung Nr. 19:
Biologische Auswertung eines Chromatogramms des Extraktes aus dem Rf-Bereich A_5 Laufmittel V.

4. Darstellung der Methylester.

Die gewonnene Menge der isolierten Substanzen war ausschlaggebend dafür, daß nur von den Gibberellinen A_5 und A_X Methylester dargestellt werden konnten.
Die Herstellung+ der Methylester erfolgte mit den Gibberellinen A_3, A_1 und A_5 als Vergleichssubstanzen, sowie mit den isolierten Gibberellinen A_5 und A_X, unter Verwendung von Diazomethan
Dabei wurde wie folgt verfahren:
15 ml 45 %-ige Kalilauge wurden in einem Erlenmeyerkolben mit 70 ml Äther überschichtet und nach Kühlung auf 0 bis -5° C mit 5 g Nitrosomethylharnstoff unter Rühren versetzt. Die Lösung färbte sich durch das entstehende Diazomethan gelb. Nach 20 Minuten wurde der Äther abdekantiert, mit etwa 20 Plätzchen KOH versetzt und eine Stunde bei 0 bis -5° C belassen. Die Gibberelline, die sich in Reagenzröhrchen befanden, wurden mit ca. 2 ml wasserfreiem Äther aufgenommen und in eine Eis-Kochsalz-Kältemischung eingebracht. Nach Hinzufügen der gleichen Menge einer ätherischen Diazomethan-Lösung wurden die Reagenzgläser mit den verschiedenen Gibberellinen unter wiederholtem Umschütteln eine halbe Stunde in der Kältemischung, und eine weitere halbe Stunde bei Raumtemperatur belassen. Schließlich wurden die Röhrchen im Wasserbad bei 40° C zur Trockne abgedunstet.

+ Für seine Hilfe bei der Herstellung der Methylester sei an dieser Stelle Herrn G. Dörhöfer, Institut für Organische Chemie, Würzburg, gedankt.

Dünnschichtchromatographie der Methylester.

Mit dem Fließmittel III konnten auf Kieselgel G DC-Platten für die Methylester der Vergleichsgibberelline A_5, A_3 und A_1 sowie für die der isolierten Gibberelline A_X und A_5 folgende Rf-Werte ermittelt werden.

Rf-Werte der Methylester.

Me A_1	Me A_3	Me A_5	Me A_5 (gefunden)	Me A_X
0,15	0,14	0,38	0,38	0,08

Die Laufzeit betrug ca. 2 bis 2 1/2 Stunden. Die Laufmittelfront erreichte eine Höhe von 15 cm.

Die Rf-Werte der Methylester bestätigen, daß das aus dem Erbsentest isolierte A_5 mit dem Reingibberellin A_5 identisch ist und die biologisch aktive Substanz A_X mit den Gibberellinen A_1 und A_3 nicht übereinstimmt.

5. Bestimmung der relativen Aktivitäten.

Die unterschiedliche biologische Wirkungsweise von Gibberellinen (Gibberellin A_3 als Bezugsgröße) ermöglicht die Bestimmung ihrer relativen Aktivität. Diese kann zu Aussagen über die Identität der Gibberelline herangezogen werden.

Gemäß den Ausführungen im methodischen Teil (s.S. 24) wurden zur Auswertung der biologischen Teste für die isolierten Gibberelline A_5, A_6 und A_X folgende Versuchsanordnung

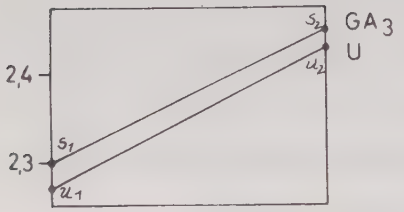
Proben der genannten Gibberelline wurden jeweils mit 0,2 ml einer 0,05 %-igen, wäßrigen Tween-Lösung aufgenommen. Aus den so erhaltenen Test-Lösungen wurde von A_5 und A_X jeweils eine zweite Konzentration im Verdünnungsverhältnis 1:10 bereitet und in beiden Konzentraten auf Testpflanzen aufgetragen. Da Gibberellin A_6 nur in geringer Menge zur Verfügung stand, konnte es nur in einer Konzentration appliziert werden.

Zur Ausführung der Untersuchung wurden die Gibberellin-Lösungen zunächst auf Zwergerbsen Progress Nr. 9 in Mengen von je 10 λ pro Erbse aufgetragen, wobei für jede Konzentration 4 Testpflanzen der Länge 2,3 cm zur Verfügung standen. Im Anschluß daran wurden Teste mit den Mais-Mutanden d 1 und d 5 ausgeführt. Dabei wurden neben 10 λ der betreffenden Gibberellin-Lösungen noch 40 λ der Tween-Lösung in die erste Blattscheide von jeweils 4 Maispflanzen gegeben. Als Kontrollen dienten mit 50 λ Tween-Lösung behandelte Mutanten. Bezugsgröße war für alle biologischen Teste je eine Gibberellin-A_3-Standardkurve, deren Konzentrationen untereinander im Verdünnungsverhältnis 1:10 standen. Bei der statistischen Auswertung der Untersuchungen [+] wurden zwei bzw. drei Punkte aus dem linearen Teil der jeweiligen Gibberellin-A_3-Konzentrationskurve entnommen.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind neben den Abbildungen Nr. 20, 21 und in Tabelle 1 aufgeführt.

[+] Herrn H. Rieger, Rechenzentrum der Universität Würzburg, danke ich für die Erstellung eines Programms, mit dem die statistischen Auswertungen erfolgten.

Abbildung Nr. 20: Relative Aktivitäten von Gibberellin A_5.



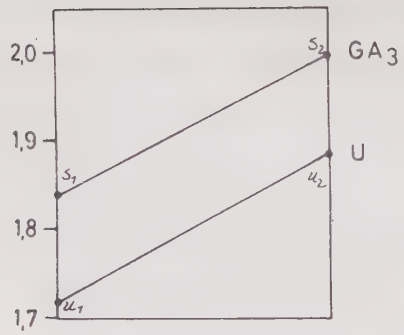
Zwergerbsentest Progress Nr.9:

Relative Aktivität: 0,64

Vertrauensgrenzen: 0,55 - 0,74

F-Test:

Unterschied	42,41
Anstieg	1128,76
Divergenz	0,01



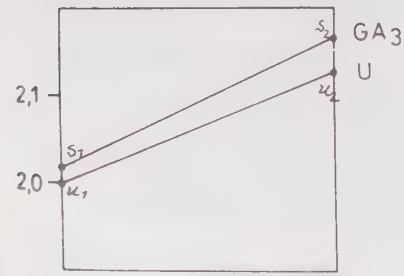
Mais-Mutante d 1:

Relative Aktivität: 0,21

Vertrauensgrenzen: 0,11 - 0,35

F-Test:

Unterschied	55,43
Anstieg	121,39
Divergenz	0,01



Mais-Mutante d 5:

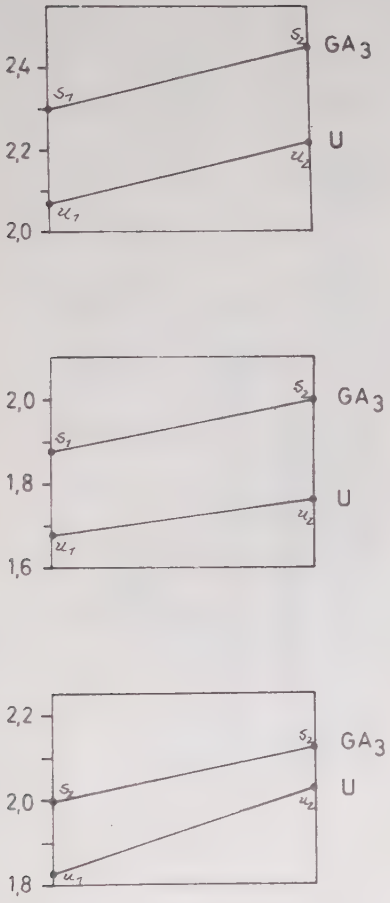
Relative Aktivität: 1,60

Vertrauensgrenzen: 1,08 - 2,44

F-Test:

Unterschied	6,83
Anstieg	163,69
Divergenz	1,23

Abbildung Nr. 21: Relative Aktivitäten von Gibberellin A_X.



Zwergerbsentest Progress Nr. 9

Relative Aktivität: 0,03

Vertrauensgrenzen: 0,02 - 0,04

F-Test:

Unterschied	1457,14
Anstieg	607,65
Divergenz	0,02

Mais-Mutante d 1

Relative Aktivität: 0,03

Vertrauensgrenzen: 0,01 - 0,06

F-Test:

Unterschied	329,12
Anstieg	137,10
Divergenz	3,23

Mais-Mutante d 5

Relative Aktivität: 0,16

Vertrauensgrenzen: 0,07 - 0,30

F-Test:

Unterschied	50,37
Anstieg	79,38
Divergenz	0,85

Tabelle 1: Die relativen Aktivitäten von Gibberellin A_6 in verschiedenen Testsystemen.

Biolog.Test mit:	Rel.Akt.	Vertr.Grenzen	Anstieg	Präzision
A Zwergerbsen	0,10	0,05-0,16	0,47	0,16
B Mais-Mutante d 1	0,03	0,01-0,05	0,37	0,19
C Mais-Mutante d 5	0,52	0,25-1,05	0,31	0,24

Aus den relativen Aktivitäten der isolierten Gibberelline (s.Abb. Nr. 22) geht hervor, daß das gefundene Gibberellin A_5 in seiner biologischen Wirksamkeit auf Zwergerbsen und den Zwergmais-Mutanten d 1 und d 5 mit den Literaturangaben (52) übereinstimmt, während Gibberellin A_6 von diesen abweicht. Die biologische Aktivität des Gibberellins A_X, bezogen auf die A_3-Standardkurve, war auf der Mais-Mutante d 5 am größten, auf der Mutante d 1 und auf Zwergerbsen geringer, hatte bei diesen beiden aber den gleichen Wert.

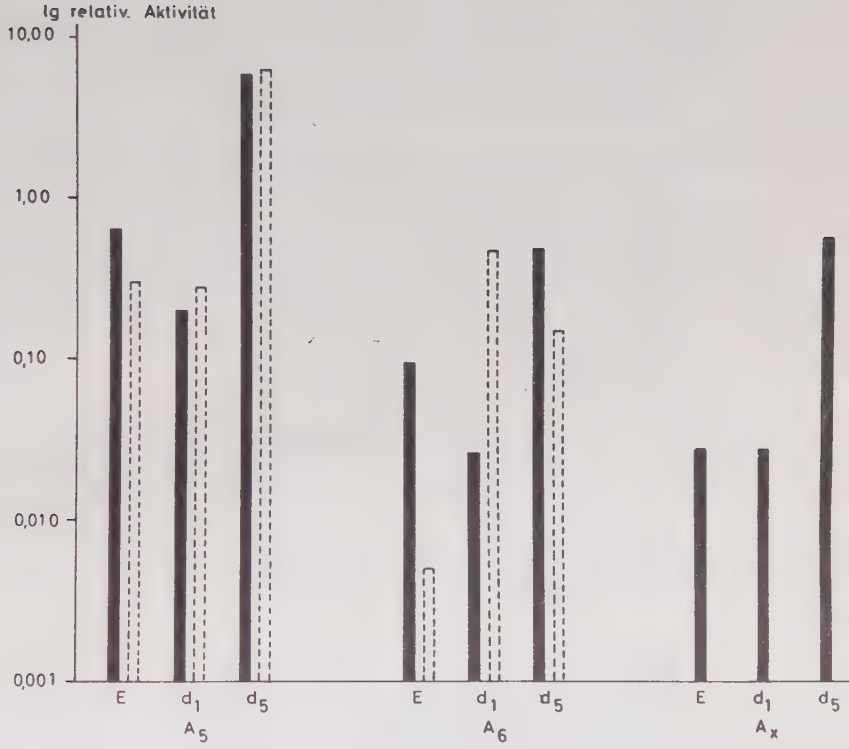


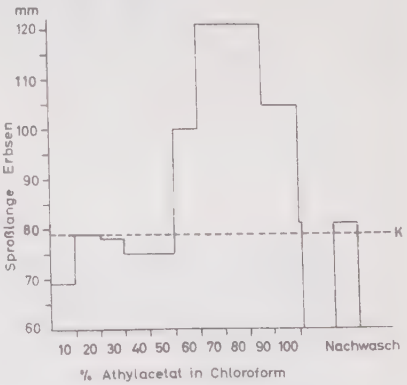
Abbildung Nr. 22:
Biologische Aktivitäten der isolierten Gibberelline A_5, A_6 und A_X (gefüllte Linien) auf Zwergerbsen (E) und Zwergmais-Mutanten (d 1 und d 5).
Ein Vergleich mit Literaturwerten (52) von Gibberellin A_5 und A_6 (unterbrochene Linien).

6. Untersuchung der Gibberelline im Rf-Bereich A_8.

Die Kieselgelstreifen des Rf-Bereiches A_8 wurden nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung des Rohextraktes A Zusammengelegt und analog den Kieselgelstreifen der Rf-Bereiche A_3 und A_5 mit Aceton eluiert (s.S. 28). Als Methode zur Reinigung und Isolierung des Extraktes diente die Säulenchromatographie an Celite-Silicagel. Zur Ausführung wurden ca. 0,4 g des Extraktes an 2,0 g Silicagel M.F.C. adsorbiert und trocken auf eine Celite-Silicagel-Säule aufgebracht. Die Elution erfolgte in 10 %-Stufen mit steigendem Anteil Äthylacetat in Chloroform, wobei jede Fraktion aus 200 ml bestand. Eine Nachelution wurde mit 200 ml Methanol vorgenommen.

Wie ein nachfolgender Erbsentest ergab, traten die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen im Bereich von 60 bis 100 % Äthylacetat auf. Der Methanol-Nachwasch wies keine aktiven Substanzen auf (s. Abb. Nr. 23).

Abbildung Nr. 23:
Verteilung der biolog. Aktivität des Extraktes aus dem Rf-Bereich A_8 an einer Celite-Silicagel-Säule, nachgewiesen im Zwergerbsentest.



Zur weiteren Untersuchung der biologisch aktiven Substanzen wurde eine Probe des Extraktes auf einer Kieselgel G DC-Platte mit dem Fließmittel I aufgetrennt. Die Gibberelline A_8 und A_3 dienten als Vergleichssubstanzen. Die Laufzeit betrug 3 1/2 Stunden. Nach beendeter Chromatographie erfolgte eine Unterteilung der Kieselgelschicht entsprechend den Positionen der oben genannten Gibberelline.

Aus Abbildung Nr. 24 geht hervor, daß eine Substanz mit biologischer Aktivität nur am Start auftrat, während der Rf-Bereich von Gibberellin A_8 keine wachstumsfördernde Wirkung zeigte.

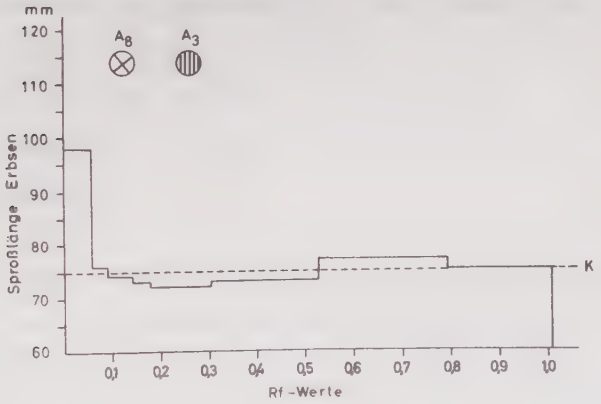


Abbildung Nr. 24:
Biologische Auswertung der dünnschichtchromatographischen Auftrennung des Extraktes aus dem Rf-Bereich A_8.

Bei dieser gibberellinartigen Substanz am Start handelt es sich wahrscheinlich um ein sogenanntes "gebundenes Gibberellin" (56, 57), das in die Äthylacetatphase übergegangen ist.

Für diese Annahme spricht auch das Auftreten der biologischen Aktivität im Bereich von 60 bis 100 % Äthylacetat bei der säulenchromatographischen Auftrennung.

In gleicher Weise deutete das Fehlen der für A_8 charakteristischen blauen Fluoreszenz im UV-Licht (365 nm) auf die Abwesenheit dieses Gibberellins hin. Eine DC-Platte war bei diesem Versuch nach Auftrennung einer Probe des Extraktes unter Zugabe von Vergleichsgibberellin A_8 mit 70 %-iger, wäßriger Schwefelsäure besprüht und 20 Minuten bei 120° C erhitzt worden. Dabei hatte sich nur das Gibberellin A_8 durch blaue Fluoreszenz zu erkennen gegeben.

Wie das Ergebnis dieser Teste zeigte, konnte in Erbsensamen das Gibberellin A_8 nicht nachgewiesen werden.

II. Butanollösliche Gibberelline.

Nach Arbeiten von SEMBDNER und Mitarbeitern (56, 57) sowie MURAKAMI (40) werden durch n-Butanol-Ausschüttlung von angesäuerten, wäßrigen Pflanzenextrakten sogenannte "gebundene", gibberellinartige Substanzen nach vorangegangener Äthylacetatausschüttlung erfaßt. Demzufolge schien eine Untersuchung der Butanolphase von Pisum sativum auf biologisch aktive Substanzen angezeigt.

Proben der methanolischen Lösung des Rohextraktes B wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel G DC-Platten der Schichtdicke 0,4 mm mit den Fließmitteln I und VI aufgetrennt. Nach Unterteilung der DC-Platten in 0,5 bis 1,0 cm breite Zonen entfernte ich diese von der Platte und eluierte mit Methanol. Die Extrakte der einzelnen Zonen wurden im Erbsentest auf ihre biologische Aktivität untersucht.

Während nach Verwendung des Fließmittels I der Erbsentest auswies, daß die biologisch aktiven Substanzen alle am Start blieben (Abbildung 5), hatte die Verwendung des Fließmittels VI eine Auftrennung dieser Aktivität am Start in zwei wachstumsfördernde Zonen zur Folge. Sie verteilten sich auf den Start und eine Zone mit dem Rst-Wert ($Rf\ A_3$ = 1,00) 0,8. Siehe Abbildung Nr. 26. Die Ergebnisse dieser dünnschichtchromatographischen Auftrennungen deuten darauf hin, daß auch die Butanolphase des Erbsenextraktes zwei biologisch wirksame Substanzen aufweist.

Biologische Auswertung der dünnschichtchromatographischen Auftrennung des Rohextraktes B:

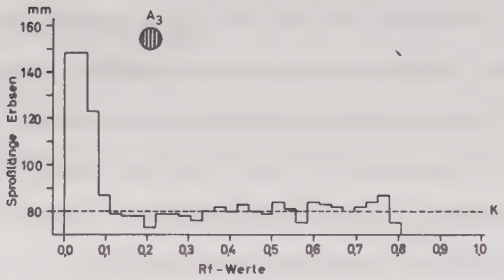


Abbildung Nr. 25:
a) mit dem Fließmittel I

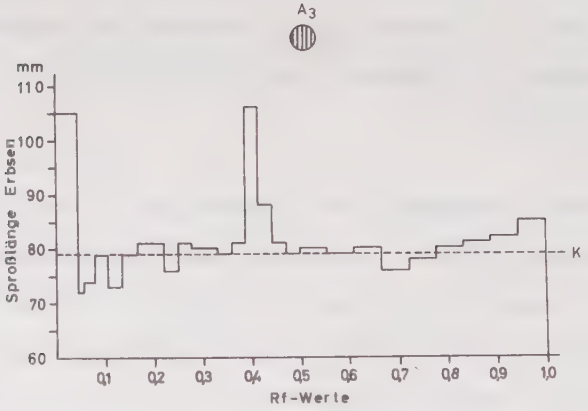


Abbildung Nr. 26:
b) mit dem Fließmittel VI

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden aus Samen von Pisum sativum wachstumsfördernde Substanzen isoliert und biologisch nachgewiesen.

Aus dem Untersuchungsmaterial wurden vornehmlich die Gibberelline A_5 und A_X isoliert.

Die biologisch aktive Substanz A_5 stimmte sowohl in ihrem Rf-Wert als auch in dem Rf-Wert ihres Methylesters mit den Vergleichssubstanzen überein. Im Zwergerbsentest und auf den Zwergmaismutanten d 1 und d 5 zeigte sie in Bezug auf Gibberellin A_3 gleiches biologisches Verhalten wie in der Literatur angegeben (52). Aufgrund der angeführten Untersuchungsergebnisse konnte es eindeutig als Gibberellin A_5 identifiziert werden.

Die biologisch aktive Substanz A_X trat bei der dünnschichtchromatographischen Trennungsmethode mit den Gibberellinen A_1 und A_3 zwar im gleichen Rf-Bereich auf, unterschied sich aber von diesen deutlich in seinen Wanderungseigenschaften. Die Positionen der Absorptionsbanden im IR-Spektrum sowie die annähernd identische Lage der Maxima ihrer Emissionsspektren:

A_1 (458 m), A_3 (467 m), A_X (464 m)

sind Hinweise dafür, daß es sich bei A_X um einen Stoff mit Gibbanstruktur handelt.

Die Anwesenheit von Gibberellin A_6 neben Gibberellin A_5 ist im vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht auszuschließen. Für diese Vermutung spricht der ermittelte Rf-Wert. Die Bestimmung des Rf-Wertes von A_6 und A_5 wurde nach der Methode von MACMILLAN und SUTER (37) vorgenommen. Dabei wurde für das isolierte Gibberellin A_5 und seiner Vergleichssubstanz ein höherer Rf-Wert ermittelt als von MACMILLAN und SUTER angegeben, was vermutlich auf die unterschiedliche Beschichtung der Kieselgur G DC-Platten zurückzuführen ist. Da jedoch in den vorliegenden dünnschichtchromatographischen Untersuchungen das Verhältnis der Rf-Werte von A_6 zu A_5 dem von MACMILLAN et al. ermittelten gleich war, kann auf A_6 geschlossen werden. Das biologische Verhalten von A_6 hingegen im Zwergerbsentest und auf den Zwergmaismutanten d 1 und d 5 stimmt nicht so weit überein, daß auf das Vorhandensein von A_6 in den Samen von Pisum sativum geschlossen werden kann. Diesem Untersuchungsergebnis zufolge wäre die Anwesenheit einer nicht mit A_6 identischen Substanz möglich.

Die gibberellinähnliche Substanz, die von KENDE und LANG (25) in Sprossen von keimenden Erbsen neben Gibberellin A_5 gefunden und aufgrund ihres säulen- und dünnschichtchromatographischen sowie biologischen Verhaltens dem Gibberellin A_1 zugeordnet worden war, konnte im vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht nachgewiesen werden. In oben genannter Arbeit jedoch war eine exakte Bestimmung von A_1 mit der angegebenen dünnschichtchromatographischen Methode nicht möglich, da das verwendete Fließmittelsystem

keine genaue Differenzierung zwischen A_X und A_1 zuläßt. Es besteht durchaus die Möglichkeit, daß in Samen und Sprossen der gleichen Pflanze unterschiedliche Gibberelline auftreten.

Nach SEMBDNER und Mitarbeitern (56) konnten nach der sauren Äthylacetatausschüttlung eines wäßrigen Bohnenextraktes durch Extrahieren mit n-Butanol sogenannte "gebundene Gibberelline" erfaßt werden. Genannten Autoren zufolge handelt es sich dabei um gibberellinartige Substanzen mit stark polarem Charakter, die entweder an Zucker, oder an Proteine gebunden sind. Je nach Größe des Zucker- oder Proteinanteils sind sie bereits mit Äthylacetat erfaßbar. Die Hauptmenge dieser Substanzen jedoch geht, ihrem polaren Charakter entsprechend, in die Butanolphase über.

Auch in vorliegender Arbeit wurde aus dem Extrakt der Butanol-Phase biologische Aktivität nachgewiesen. Bei diesen Untersuchungen wurde bei der Dünnschichtchromatographie mit dem Fließmittel I keine Auftrennung erzielt: Die biologische Aktivität war nur am Start nachweisbar. Bei Verwendung des stärker polaren Fließmittels VI hingegen konnte eine Auftrennung in zwei biologisch aktive Substanzen erzielt werden, woraus zu ersehen ist, daß es sich um Substanzen mit unterschiedlicher Polarität handelt.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Samen von Pisum sativum L. auf Gibberelline untersucht. Die Aufarbeitung des Extraktes erfolgte dünnschichtchromatographisch präparativ.

Dabei wurde eine neue, gibberellinartige Substanz A_X isoliert, die sich aufgrund ihres IR- und Emissionsspektrums als ein Gibberellin mit Gibbanstruktur erwies.

Neben Gibberellin A_X konnte Gibberellin A_5 identifiziert werden und die Anwesenheit von Gibberellin A_6 wahrscheinlich gemacht werden. Von allen isolierten Substanzen wurden zu ihrer Charakterisierung die Rf- und Rst-Werte, sowie ihre relative Aktivität bestimmt.

Auch in der Butanolphase traten gibberellinartige Substanzen auf, deren Trennung auf dünnschichtchromatographischem Weg gelang.

Literaturverzeichnis

1. Bliss, C.J.: The statistics of bioassay, with special reference to the vitamins. Vitamin Methods, Vol.II Academic Press, New York (1952).

2. Brian, P. W., G.W. Elson, H. G. Hemming and M. Radley: The plant growth promoting properties of gibberellic acid, a metabolic product of the fungus Gibberella fujikuroi. J. Sci. Food Agr. 5, 602-612 (1954).

3. Brian, P. W., J. F. Grove and J. MacMillan: The gibberellins. Fortschr.Chem. Org. Naturstoffe 18, 350-433 (1960).

4. Brian, P. W. and H. G. Hemming: The effect of gibberellic acid on shoot growth of pea seedlings. Physiol. Plantarum 8, 669-681 (1955).

5. Cross, B. E.: New metabolites of Gibberella fujikuroi Part XI. Gibberellin A_{14}. J. Chem. Soc., 501-504 (1966).

6. Cross, E. E., R. H. B. Galt and J. R. Hanson: New metabolites of Gibberella fujikuroi. Part VIII. Gibberellin A_{12}. J. Chem. Soc., 1570-1572 (1965).

7. Cross, B. E., R. H. B. Galt and J. R. Hanson: Recent work on the gibberellins. I. The biosynthesis of the gibberellins. Regulatuers Naturels de la Croissande Vegetale. 265-272, Paris (1964).

8. Cross, B. E., R. H. B. Galt, J. R. Hanson, J. MacMillan, J. C. Seaton and P. J. Suter: Some recently discovered gibberellins. Eigenschaften und Wirkungen der Gibberelline. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962).

9. Cross, B.E., R. H. B. Galt and J. R. Hanson: New metabolit of Gibberella fujikuroi I. Gibberellin A_7 and gibb A_9. Tetrahedron 18, 451-459 (1962).

10. Cross, B. E. and K. Norton: New metabolites of Gibberella fujukuroi. Part VIII. Gibberellin A_{12}. J. Chem. Soc., 1570-1572 (1965).

11. Curtis, P. J. and B. E. Cross: Gibberellic acid. A new metabolite from the culture filtrate of Gibberella fujikuroi. Chem. and Ind., 1066 (1954).

12. Elson, G. W., D. F. Jones, J. MacMillan and P. J. Suter: Plant hormones IV. Identification of the gibberellins of Echinocystis macrocarpa Greene by thin layer chromatography. Phytochemistry 3, 93-101 (1964).

13. Emmens, C. W.: Principles of Biological Assay. Chapman and Hall, London (1948).

14. Galt, R. H. B.: New metabolites of Gibberella fujikuroi. Part IX. Gibberellin A_{13}. J. Chem. Soc., 3143-3151 (1965).

15. Grove, J. F.: The gibberellins. Quart.Rev. 15, 56-70 (1961).

16. Hashimoto, T. and L. Rappaport: Variations in endogenous gibberellins in developing bean seeds. I. Occurrence of neutral and acidic substances. Plant Physiol. 41, 623-628 (1966).

17. Hayashi, F., S. Blumenthal-Goldschmidt and L. Rappaport: Acid and neutral gibberellin-like substances in potato tubers. Plant Physiol. 37, 774-780 (1962).

18. Hayashi, F. and L. Rappaport: Gibberellinlike activity of neutral acidic substances in the potato tuber. Nature 195, 617-618 (1962).

19. Hayashi, F. and L. Rappaport: Isolation, crystallization, and partial identification of potato factor II from potato tubers. Plant Physiol. 41, 53-58 (1966).

20. Jones, D. F.: Examination of the gibberellins of Zea mays and phaseolus multiflorus using thin-layer chromatography. Nature 202, 1309-1310 (1964).

21. Jones, D. F., J. MacMillan and M. Radley: Plant hormones III. Identification of gibberellin acid in immature barley and immature grass. Phytochemistry 2, 307-314 (1963).

22. Kahn, A. and J.A. Goss: Effect of gibberellin on germination of the lettuce seed. Science 125, 645-646 (1957).

23. Kalistratos, G., D. Padval and A. Pfau: Über chemische Reaktionen der Gibberellinsäure. Eigenschaften und Wirkungen der Gibberelline. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962).

24. Kawarada, A. and Y. Sumiki: Occurrence of gibberellin A_1 in water sprouts of Citrus. Bull Agr. Chem. Soc. Japan 23, 343-344 (1959).

25. Kende, H. and A. Lang: Gibberellins and Light inhibition of stem growth in peas. Plant Physiol. 39, 435-440 (1964).

26. Khalifah, R. A.: Gibberellinlike substances from developing banana fruit. Plant Physiol. 41, 771-773 (1966).

27. Khalifah, R. A., L. N. Lewis and Ch. W. Coggins: Isolation and properties of gibberellinlike substances from citrus fruits. Plant Physiol. 40, 441-445 (1965).

28. Koshimizu, K., H. Fukui and T. Kusaki: A new C_{20} gibberellin in immature seeds of Lupinus luteus. Tetrhedron Letters 22, 2459-2463 (1966).

29. Lang, A.: Stem elongation in a rosette plant, induced by gibberellin acid. Naturwissenschaften 43, 257-258 (1956).

30. Lang, A. and E. Reinhard: Gibberellins and flower formation. Gibberellins. Advan. Chem. Ser. 28, 71-79 (1961).

31. Lockhart, J. A.: Reversal of the light inhibition of pea stem growth by the gibberellins. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 42, 841-848 (1956).

32. McComb, A. J.: "Bound" gibberellins in mature runner been seeds. Nature 192, 575-576 (1961).

33. MacMillan, J., J. C. Seaton and S.J. Suter: Plant Hormones I. Isolation of gibberellin A_1 and gibberellin A_5 from Phaseolus multiflorus. Tetrahedron 11, 60-66 (1960).

34. MacMillan, J., J. C. Seaton and P. J. Suter: Isolation and structures of gibberellins from higher plants. Gibberellins. Advan. Chem. Ser. 28, 18-25 (1961).

35. MacMillan, J., J. C. Seaton and P. J. Suter: Plant Hormones II. Isolation and structures of gibberellin A_6 and gibberellin A_8. Tetrahedron 18, 349-355 (1962).

36. MacMillan, J. and P. J. Suter: The occurrence of gibberellin A_1 in higher plants: Isolation from the seed of runner bean (Phaseolus multiflorus). Naturwissenschaften 45, 46 (1958).

37. MacMillan, J. and P. J. Suter: Thinlayer chromatography of the gibberellins. Nature 197, 790 (1962).

38. Murakami, Y.: A paper chromatographic survey of gibberellins and auxins in immature seeds of leguminous plants. Bot. Mag. Tokyo 72, 36-43 (1959).

39. Murakami, Y.: The occurrance of gibberellins in mature dry seeds. Bot. Mag. Tokyo 72, 438-442 (1959).

40. Murakami, Y.: Occurrence of watersoluble gibberellin in higher plants. Bot. Mag. Tokyo 75, 451-452 (1962).

41. Neely, P. M.: The development and use of a bioassay for gibberellins. Ph. D. Dissertation Univ. Calif., Los Angeles (1959).

42. Paleg, L.G.: Physiological effects of gibberellic acid: II on starch hydrolysing enzymes of barley endosperm. Plant Physiol. 35, 902-906 (1960).

43. Paleg, L. G.: Physiological effects of gibberellins. Ann. Rev. Plant Physiol. 15, 291-322 (1965).

44. Phinney, B. O.: Growth response of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 42, 185-189 (1956).

45. Phinney, B. O. and Ch. A. West: The growth response of single gene dwarf mutants of Zea mays to gibberellins and to gibberellin-like substances. Proc. Internat. Genetics Symp., Cytologia Suppl., 384-385 (1956).

46. Phinney, B. O. and Ch. A. West: Gibberellins as native plant growth regulators. Ann. Rev. Plant Physiol. 11, 411-436 (1960).

47. Phinney, B. O. and Ch. A. West: Gibberellins and plant growth. Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. XIV, 1185-1227 (1961).

48. Phinney, B. O., Ch. A. West, M. Ritzel and P. M. Neely: Evidence for gibberellinlike substances from flowering plants. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 43, 399-404 (1957).

49. Radley, M.: Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants. Nature 178, 1070-1071 (1956).

50. Radley, M.: The distribution of substances similar to gibberellic acid in higher plants. Ann. Bot. N. S. XXII, 297-307 (1958).

51. Radley, M.: Gibberellin content of spinach in relation to photoperiod. Ann. Bot. N. S. 27, 373-377 (1963).

52. Reinhard, E.: Über Veränderungen des Gibberellingehaltes von Hyoscyamus niger. Habilitationsschrift (1962).

53. Reinhard, E., W. Konopka u. R. Sacher: Zur Trennung der Gibberelline in Pflanzenextrakten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. J. Chromatography 16, 99-105 (1964).

54. Sachs, R. M., C. Bretz and A. Lang: Cell division and gibberellic acid. Experim. Cell Res. 18, 230-244 (1959).

55. Sembdner, G., R. Gross u. K. Schreiber: Die Dünnschichtchromatographie von Gibberellinen. Experientia XVIII, 584-585 (1962).

56. Sembdner, G., G. Schneider, J. Weiland u. K. Schreiber: Über ein gebundenes Gibberellin aus Phaseolus coccineus L., Experientia 20, 89-90 (1964).

57. Sembdner,G. u. K. Schreiber: Gibberelline - IV. Über die Gibberelline von Nicotiana tabacum L. Phytochemistry 4, 49-56 (1965).

58. Schmidt, W.: Anlage und statistische Auswertung von Untersuchungen, M. u. H. Schaper, Hannover (1961).

59. Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie. Laboratoriums-Handbuch, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962).

60. Stodola, F. H., K. B. Raper, D. I. Fennell, H. F. Conway, V. E. Sohns, C. T. Langford and R. W. Jackson: The microbiological production of gibberellins A and X. Arch. Biochem. Biophys. 54, 241-245 (1955).

61. Tamura, S., N. Takahashi and N. Murofushi: Isolation and structure of novel gibberellin in Bamboo shoots. (Phyllostachs edulis). Tetrahedron letters 22, 2465-2472 (1966).

62. Tamura, S., A. Sakurai, K. Kainuma and M. Takai: Isolation of Helmithosporol as a natural plant growth-regulator and its chemical structure. Agr. Biol. Chem. 29, 216-221 (1965).

63. West, Ch. A. and K. H. Murashige: The isolation of gibberellin A_1 from beans and the chemical properties of other gibberellin-like factors from beans and peas. Plant physiol. 33, Suppl. XXXVIII (1958).

64. West, Ch. A. and B. O. Phinney: Properties of gibberellinlike factors of higher plants. Plant Physiol. Suppl. XX (1956).

65. West, Ch. A. and B. O. Phinney: Gibberellins from flowering plants. I. Isolation and properties of a gibberellin from Phaseolus vulgaris L. J. Am. Chem. Soc. 81, 2424-2427 (1959).

66. Wierzchowski, P. u. Z. Wierzchowska: Über zwei neue gibberellinartige Verbindungen des Pilzes Gibberella fujikuroi. Naturwissenschaften 48, 653 (1961).

67. Wittwer, S. H., M. J. Bukovac, H. M. Sell and L. E. Weller: Some effects of gibberellin on flowering and fruit setting. Plant Physiol. 32, 39-41 (1957).

Bezugsquellennachweis.

Die Sorptionsmittel Celite 545 J. M. (Johns-Mandelville) und Silicagel M. F. C. (Hopkins & Williams) wurden von der Fa. Karl Roth, Karlsruhe, geliefert.

Die Gibberellin-Vergleichssubstanzen wurden uns freundlicherweise von der Imperial Chemical Industries Ltd., England, kostenlos überlassen.

Herrn Professor Dr. B. O. Phinney, University of California, Los Angeles, sei für die Zwergmais-Mutanten d 1 und d 5 herzlich gedankt.

Die Zwergerbsen Progress Nr. 9 (Ferry Morse Seed Comp., USA) wurden von der Fa. Fetzer, Kitzingen, bezogen.

Alle anderen Materialien, die zur Durchführung der Arbeit benötigt wurden, stammten von der Fa. E. Merck.

Lebenslauf

Am 9. Oktober 1932 wurde ich, Johannes Karl Wolfram K o n o p k a , als Sohn des Mittelschullehrers Dr. Karl Konopka und seiner Ehefrau Anna, geb. Schusdziara, in Königsberg/Pr. geboren.

Nach vier Jahren Volksschule besuchte ich die dortige Hindenburg-Oberschule. Am Ende der Kriegsereignisse legte ich im Frühjahr 1953 in Lübeck an der Oberschule zum Dom mein Abitur ab.

Nach zweijähriger Praktikantenzeit in der Apotheke begann ich an der Universität Bonn das Pharmazie-Studium und bestand im Mai 1958 das Staatsexamen. Während der Studienzeit besuchte ich die Berlitz-Schule in Bonn und schloß mit der Dolmetscherprüfung in Englisch ab.

Nach zweieinhalbjähriger, praktischer Apothekertätigkeit studierte ich von 1961 bis 1962 Lebensmittelchemie an der TH Braunschweig und beendete dieses Studium mit dem lebensmittelchemischen Staatsexamen.

Seit dieser Zeit promoviere ich am pharmakognostischen Institut der Universität Würzburg und bin dort seit April 1964 als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle tätig.

Nun bewerbe ich mich erstmals um den Doktorgrad der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

OFFSET
JÄGER
WÜRZBURG